

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 11 月 7 日 (07.11.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/088179 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/415, C12N  
15/29, A01H 1/00, 5/00, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/04092

(22) 国際出願日: 2002 年 4 月 24 日 (24.04.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-128008 2001 年 4 月 25 日 (25.04.2001) JP  
特願2001-202082 2001 年 7 月 3 日 (03.07.2001) JP  
特願2002-20083 2002 年 1 月 29 日 (29.01.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内二丁目 5 番 2 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 今村 順 (IMAMURA, Jun) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社植物工学研究所内 Kanagawa (JP). 藤本 英也 (FUJIMOTO, Hideya) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社植物工学研究所内 Kanagawa (JP). 今井 りつ子 (IMAI, Ritsuko) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社植物工学研究所内 Kanagawa (JP). 肥塚 信也 (KOIZUKA, Nobuya) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社植物工学研究所内 Kanagawa (JP). 酒井 隆子 (SAKAI, Takako) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社植物工学研究所内 Kanagawa (JP). 早川 孝彦 (HAYAKAWA, Takahiko) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 株式会社植物工学研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN PARTICIPATING IN RESTORATION FROM CYTOPLASMIC MALE STERILITY TO FERTILITY AND GENE ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与するタンパク質及びそれをコードする遺伝子

(57) Abstract: It is intended to isolate an Rf gene, in particular a radish-origin Rf1 gene, and identify its structure. A protein participating in restoration of cytoplasmic male sterility to fertility characterized by having at least 14 pentatricopeptide repeat (PPR) motives wherein these motives are divided into at least 3 groups each having at least 2 PPR motives and the block in the carboxy-terminal (C-terminal) side has 4 PPR motives.

(57) 要約:

本発明の目的は、Rf 遺伝子、特に、ダイコン由来の Rf1 遺伝子を単離してその構造を同定することである。本発明によれば、Pentatricopeptide Repeat (以下 PPR と略) モチーフを 14 個以上持ち、該 PPR モチーフ群は 3 つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも 2 つ以上の PPR モチーフを有し、かつ、カルボキシ末端 (C 末端) 側のブロックは 4 つの PPR モチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/088179 A1



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与するタンパク質  
及びそれをコードする遺伝子

## 技術分野

本発明は、細胞質雄性不稔から可稔への回復に関与する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、一代雑種（以下、F1と略す）品種開発のために利用される細胞質雄性不稔形質（以下、cmsと略すことがある）の回復に関与する遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター及び形質転換体に関するものである。

## 背景技術

禾穀類、野菜などの農作物では、1) 雑種強勢による優れた農業形質、2) 収穫物の均一性、3) 次世代で遺伝形質が分離するため品種育成者の利益が保護される、などの特徴のもと、F1品種の開発が盛んであり、多くの主要作物で実用化されている。

F1品種の種子を生産するための方法の一つとしては、細胞質雄性不稔(cms)系統とその雄性不稔を回復する（以下、Rfと略すことがある）系統からなるcms/Rf採種システムがあり、例えばイネ、ソルガム、トウモロコシ等の禾穀類や例えばひまわりなどの油量作物で開発されているが、これらはいずれも、交配あるいは細胞融合の手法を用いて開発されたものである。

一方、アブラナ科では、自家不和合性を用いたF1採種システムが広く利用されているが、ナタネに関しては、安定な自家不和合性のないため、cms系統とRf系統を利用したF1採種システムが求められている。

これに対して、近年、コセナダイコン由来の細胞質雄性不稔（コセナcms）やオグラダイコン由来の細胞質雄性不稔（オグラcms）をナタネで利用する研究がなされている。両cms遺伝子に関しては細胞質小器官であるミトコンドリアのゲノムにコードされており、塩基配列についても知られているが、ダイコン

は、分子生物学的な研究が進んでおらず、遺伝子単離に必要なマーカーもほとんど知られていない状態であるため、核からの遺伝子の単離が困難であり、R f に関しては、ダイコンの稔性回復系統から交配あるいは細胞融合の手法を使いナタネに導入されているのみである。

さらに、R f 遺伝子に関しては、植物の各 c m s 系統により、1つ又は複数の回復遺伝子が存在する。ダイコンにおいては、R f 1 遺伝子及びR f 2 遺伝子が同時に存在することが稔性回復に必要であり、加えて、R f 1 遺伝子が、ダイコンの c m s 原因タンパク質として知られている、ミトコンドリア内のORF 1 2 5 タンパク質 (M. Iwabuchi et al. Plant Mol. Biol. 39:183-188, 1999) の蓄積量を大幅に減少させることが知られている。(育種学雑誌 47 (別1) P 186, 1997、育種学雑誌48 (別1) P 197、1998)。

またナタネにおいては、遺伝解析実験により、交配または細胞融合によって導入されたダイコンのR f 1 遺伝子が、c m s 原因タンパク質として知られているORF 1 2 5 またはORF 1 3 8 タンパク質 (M. Grelon et al. Mol. Gen. Genet. 243:540-547) の蓄積量を減少させること、これらORF 1 2 5 またはORF 1 3 8 タンパク質の蓄積量の減少と稔性が回復する現象は完全に一致していることが知られている (N. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000)。つまり、ナタネ雄性不稔系統で稔性が回復するには、ORF 1 2 5 またはORF 1 3 8 タンパク質の蓄積量の減少が必須であり、そのために、R f 1 遺伝子は重要な遺伝子である。

しかしながら、一方でR f 遺伝子の塩基配列については、トウモロコシの c m s の一つであるT-サイトプラズムに対する回復遺伝子の一つであるR f 2 遺伝子のみについては同定、単離されているが、他の植物でR f 遺伝子の塩基配列については、全く知られていない。

#### 発明の開示

交配あるいは細胞融合によりオグラダイコン由来のR f 1 遺伝子を導入したナ

タネ回復系統とその系統を父親として作出されたF1品種は、グルコシノレート（以下GSLと略す）含量が、規制値より高くなることがわかり、実用上問題となっている。これは、GSLの生合成に関与するダイコン由来の遺伝子がRf1遺伝子の近傍に存在し、遺伝的に強連鎖しているため、ナタネの回復系統（Rf系統）のGSLの含量が上昇するものと考えられている。GSLはナタネの搾油かすに含まれ、それを飼料として動物に与えたとき、甲状腺肥大をもたらすことが知られているため、ナタネ種子のGSL含量は、育種段階において、北米では $18\mu\text{mole/g}$  ヨーロッパでは $20\mu\text{mole/g}$ 以下にすることが求められている。

さらに、近年では、除草剤耐性等の機能を遺伝子組換えにより付加した植物の開発も活発であり、これらの植物を効率的に創出するためには、交配あるいは細胞融合により得られたナタネ回復系の存在のみでは不十分であり、Rf遺伝子、特に、ダイコン由来のRf1遺伝子の単離が望まれていた。

即ち、本発明は、Rf遺伝子、特に、ダイコン由来のRf1遺伝子を単離してその構造を同定することを解決すべき課題とした。さらに、本発明は、単離したRf遺伝子を利用してナタネ回復系統を確立する手段を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ダイコン及びナタネからRf1遺伝子をクローニングすることに成功し、本課題を解決するに至った。

すなわち、本発明によれば、Pentatricopeptide Repeat（以下PPRと略）モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、カルボキシ末端（C末端）側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が提供される。

上記タンパク質の好ましい態様によれば、

PPRモチーフの数が14～16個であるタンパク質；

PPRモチーフ群が3つのブロックに分割されており、アミノ末端(N末端)側から順に各ブロックが5個、7個及び4個のPPRモチーフを有するタンパク質；

アミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がセリン、スレオニン又はシステイン以外であるタンパク質；

アミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はヒスチジンのいずれかであるタンパク質；並びに

さらに、アミノ末端にミトコンドリアに移行するためのシグナルペプチド配列を有するか又はカルボキシ末端に-LysAspGluLeu-からなる配列を有するタンパク質；

が提供される。

本発明の別の側面によれば、細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と接触させた後に該転写産物にゲルシフトを起こさせることを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号26に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；

配列番号27に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；

配列番号28に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；並びに、

配列番号29に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；

が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのタンパク質が提供される。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列を有するタン

パク質；又は

(2) 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列の 80～687 番目のアミノ酸配列、配列番号 17 に記載のアミノ酸配列の 80～687 番目のアミノ酸配列、又は配列番号 19 に記載のアミノ酸配列の 82～690 番目のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかのタンパク質が提供される。

(1) 配列番号 3、配列番号 17、又は配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号 3、配列番号 17、又は配列番号 19 に記載のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

本発明において好ましくは、細胞質雄性不稔個体は、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のいずれかのタンパク質をコードする DNA が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、

配列番号 22 に記載の塩基配列を有する DNA；

配列番号 23 に記載の塩基配列を有する DNA；

配列番号 24 に記載の塩基配列を有する DNA；並びに、

配列番号 25 に記載の塩基配列を有する DNA；

が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかの DNA が提供される。

(1) 配列番号 2、配列番号 16、又は配列番号 18 に記載の塩基配列を有する DNA；又は

(2) 配列番号 2、配列番号 16、又は配列番号 18 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は

(3) 配列番号 2、配列番号 16、又は配列番号 18 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかの DNA が提供される。

(1) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列又は配列番号 15 に記載の塩基配列の 812 番目～3002 番目の塩基配列を有する DNA；又は

(2) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列又は配列番号 15 に記載の塩基配列の 812 番目～3002 番目の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は

(3) 配列番号 1 に記載の塩基配列の 3754 番目～8553 番目の塩基配列又は配列番号 15 に記載の塩基配列の 812 番目～3002 番目の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

本発明のさらに別の側面によれば、下記の何れかの DNA が提供される。

(1) 配列番号 1 又は配列番号 15 に記載の塩基配列を有する DNA；又は

(2) 配列番号 1 又は配列番号 15 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA；又は

(3) 配列番号 1 又は配列番号 15 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

本発明において好ましくは、細胞質雄性不稔個体は、コセナダイコン及び／又



はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを含有するベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は本発明のベクターを有する形質転換体が提供される。形質転換体は、好ましくは形質転換植物である。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを用いることを特徴とする、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、細胞質雄性不稔遺伝子を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞に、さらに本発明のDNAの一部又は全部を誘導型プロモーターと共に導入することにより、雄性不稔回復遺伝子の発現を制御することが可能となった形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した形質転換体を利用することによる細胞質雄性不稔系統の維持方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のDNAから任意に設定した15～50merのオリゴヌクレオチドプライマー、又は、上記した本発明のDNAの全部又は1部からなる少なくとも15mer以上のプローブを使用し、目的の生物試料中に、該プライマーにより増幅される塩基配列の量、又は、プローブにより検出される塩基配列の量が、1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認することで、細胞質雄性不稔回復に関与する遺伝子を検出する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～5091番目の塩基配列、又は配列番号15に記載の塩基配列の1番目～811番目の塩基配列を有する、プロモーターDNAが提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、Rfマーカー遺伝地図を示す。

図2は、配列番号1に記載の塩基配列を十分に保持するラムダクローンCHIの構造の模式図を示す。

図3は、形質転換体中の導入DNAをPCR法を用いて検出した結果を示す。

レーン1：コントロールベクター、レーン2：形質転換ナタネ、レーン3：細胞質雄性不稔ナタネ、

a：3186bp-3753bp、長さ：568bp

b：4869bp-5112bp、長さ：244bp

c：7766bp-8250bp、長さ：485bp

図4は、形質転換体中におけるCMSタンパクであるORF125の蓄積量の減少をウエスタンブロッティング法により解析した結果を示す。

レーン1：細胞質雄性不稔ナタネ -1- 15  $\mu$ g

レーン2：稔性回復ナタネ 15  $\mu$ g

レーン3：細胞質雄性不稔ナタネ -2- 15  $\mu$ g

レーン4～7：細胞質雄性不稔ナタネ -2-

15/2  $\mu$ g、15/4  $\mu$ g、15/8  $\mu$ g、15/16  $\mu$ g希釈系列

レーン8：形質転換ナタネ 15  $\mu$ g

図5は、形質転換ナタネの開花体から葯を取り出し、顕微鏡観察した結果を示す。

図6は、pSTV125-5' #LA6とpSTV125-5' #LA12の塩基配列を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

#### (1) 本発明のタンパク質の態様

本発明のタンパク質は下記(i)から(v)のいずれかのタンパク質に関する。

(i) Pentatricopeptide Repeat (以下PPRと略) モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、カルボキシ末端(C末端)側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；

(i i) 細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と接触させた後に該転写産物にゲルシフトを起こさせることを特徴とするタンパク質；

(i i i) 配列番号26～29の何れかに記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

(i v) 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質；並びに、

(v) 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3、配列番号17、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3、配列番号17、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

本明細書において、PPRモチーフとは「Pentatricopeptide Repeat」モチーフのことを称す。このPPRモチーフは、アラビドピシスのゲノムプロジェクトの進行によって見出された新しいタンパク質のモチーフ構造である。その基本モチーフは35個の縮重した (degenerate) したアミノ酸配列が、そのタンパク質の一次構造上でタンデムに繰り返されたものである。PPRモチーフは、コンセンサスアミノ酸

配列として、アミノ末端（N末端）-「VTYNTLISGYCKNGKLEEALELFEEEMKEKGIKPDV」-カルボキシ末端（C末端）に代表される配列を有する。このモチーフは、Small and Peeters（文献 Trends Biochem Sci 2000, 25 46-47）によって提唱されたもので、アラビドピシスのゲノム中には、このモチーフを取りうる遺伝子が、この文献が出版された時点で200ほどGenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) などの遺伝子バンクに報告されている。現在、ある任意のタンパク質が、このモチーフ構造を持ち得るのか否か判断は、英国のサンガー研究所内にあるProtein families database of alignments and HMNs（以下Pfamと略、<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>）にあるプログラムで容易に判断することができる。

現在までのところでPPRモチーフを有するタンパク質の機能が明らかになっている例としては、1) ミトコンドリアに移行するタンパク質である酵母のPET309やアカパンカビのCYA-5が、ミトコンドリア遺伝子であるcox1 mRNAと相互作用をしてcox1の発現を転写後のプロセッシングもしくは翻訳のレベルで制御している例（Manthey and McEwen EMBO J 1995 14 4031-4043, Coffin et. al. Curr Genet 1997 32 273-280）や2) 葉緑体に移行するPPRモチーフタンパク質であるトウモロコシのCRP1が、葉緑体遺伝子であるpetAおよびpetD遺伝子の翻訳に必須であり、加えてpetDmRNAのプロセッシングのステップにも必須である例（Fisk et. al. EMBO J 1999 18 2621-2630）等が挙げられ、従って、PPRモチーフを有するタンパク質は、何らかの形で翻訳制御に関わっている可能性が高いと推察される。

今回、本発明者らがコセナダイコン細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する遺伝子を単離したところ、それによりコードされているタンパク質は、Pentatricopeptide Repeat（以下PPRと略）モチーフを14個以上持ち、加えて該PPRモチーフ群が3つ以上のブロックに分割されており、さらに該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、最もカルボキシ末端（C末端）側に存在するブロックは4つのPPRモチーフを有する

ものであることを見出した。

上述の細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質として好ましくは、PPRモチーフの数が14～16個のものであり、より好ましくはPPRモチーフ群が3つのブロックに分割されており、アミノ末端(N末端)側から順に各ブロックが5個、7個及び4個のPPRモチーフを有するものである。

具体的には、

- (1) PPRクラスター#1: N末端から1番目のPPRモチーフから5番目のPPRモチーフが連続した175残基からなるPPRクラスター、
  - (2) PPRクラスター#2: N末端から6番目のPPRモチーフから12番目のPPRモチーフが連続した245残基からなるPPRクラスター、
  - (3) PPRクラスター#3: N末端から13番目のPPRモチーフから16番目のPPRモチーフが連続した140残基、
- からなるものである。

更に好ましくはアミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がセリン、スレオニン又はシステイン以外であるものであり、更に好ましくはアミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はヒスチジンのいずれかであるものであり、特に好ましくはアミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギンであるものである。

通常、稔性回復遺伝子は、核ゲノムに存在し、細胞質雄性不稔遺伝子はミトコンドリアに存在する事が知られているため、上記細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質は、さらに、アミノ末端にミトコンドリアに移行するためのシグナルペプチド配列を有するか又はカルボキシ末端に「LysAspGluLeu」からなる配列を有することが好ましい。

該ミトコンドリアに移行するためのN末端のシグナルペプチドとしては、0..

Emanuelsson ら (J. Mol. Biol. 300, 1005-1016 (2000) のアルゴリズムを基にした予測プログラム「TargetP」 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 又は予測プログラム「Psort」 (<http://psort.nibb.ac.jp/>) から確認されるものが挙げられ、また、該シグナルペプチドの具体例としては、シロイヌナズナ AtOXA1 遺伝子のシグナルペプチド (W. Sakamoto et al: Plant Cell Physiol, 41:1157-1163)

(MetAlaPheArgGlnThrLeuSerIleArgSerArgLeuPheAlaArgArgAsnGlnProValTyrHisIleIleProArgGluSerAspHisGluArgAsp) といった配列が挙げられる。このうち、好ましくは配列番号 3 に記載のアミノ酸配列における 1～79 のアミノ酸配列が挙げられ、特に好ましくは、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列における 1～34 のアミノ酸配列が挙げられる。

また、本発明の細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質は、細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と結合することにより、その細胞質雄性不稔遺伝子の翻訳阻害を起こさせ、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復させるものである。

細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物としては、コセナ細胞質雄性不稔を引き起こす原因タンパク質である ORF 125 又はオグラ細胞質雄性不稔を引き起こす原因タンパク質である ORF 138 のそれぞれの遺伝子の転写産物 (mRNA) が挙げられ、好ましくは該遺伝子の 5' -UTR (Bonhomme et al; Mol Gen Genet, 235:340-348 (1992) 領域が挙げられる。

細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と結合するか否かを確認する方法としては、in vitro で人工的に転写させた orf125 又は orf 138 の mRNA に本発明のタンパク質を加え、電気泳動させる方法、いわゆるゲルシフト法が挙げられ、具体的操作方法としては、ゲルシフト法として、通常行われているような条件で行えばよい。

また、ORF 125 又は ORF 138 の遺伝子と、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼやルシフェラーゼのような検出可能なレポーター遺伝子との融合遺伝子は大腸菌などに発現させたものに、さらに本願タンパク質を加えることで発現が抑制されるか否かを確認する方法も挙げられる。

具体的には、配列番号 2 の塩基配列で示される稔性回復遺伝子が大腸菌発現ベクターに組み込んだものと、orf125の5' -UTR領域と25アミノ酸のコーディング部分をLacZ遺伝子に融合したベクターを大腸菌に組み込み込んだものを作成し、誘導発現させると、稔性回復遺伝子を組み込んだ発現ベクターを同居させた場合にのみ、LacZ遺伝子の発現が抑制されて、X-Galの存在下で青い大腸菌コロニーが白くなる。このように本願タンパク質をコードする遺伝子を利用し、上記のような確認を行うことによって、細胞質雄性不稔遺伝子の翻訳阻害を起こさせることにより、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復させる機能を有することが確認できる。

本発明の細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質の中で最も好ましいものとしては、コンセンサス配列である配列番号 26～29に記載のアミノ酸配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは92%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。コンセンサス配列としては配列番号 26に記載のアミノ酸配列が挙げられ、好ましくは配列番号 27又は28に記載のアミノ酸配列が挙げられ、特に好ましくは配列番号 29に記載のアミノ酸配列が挙げられる。

また、上記したタンパク質の好ましい具体例としては、

(1) 配列番号 3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号 17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号 19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号 3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号 17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号 19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク

質が挙げられる。

また、該配列にミトコンドリアへの移行配列を有するものとしては、

(1) 配列番号 3、配列番号 17、又は配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号 3、配列番号 17、又は配列番号 19 に記載のアミノ酸配列において 1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質が挙げられる。

本発明のタンパク質は、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与することができるタンパク質である。より具体的には、本発明のタンパク質をコードする DNA が導入されている形質転換植物 (R f 系統) を細胞質雄性不稔系統 (c m s 系統) の個体と交配させた場合に、稔性の回復された F1 種子を得ることができる。上記 c m s 系統の個体として好ましくは、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子が導入された個体が挙げられる。

本発明のタンパク質は、上述のようなゲルシフト法を利用してスクリーニングをし、単離したり、下記で説明する本発明の DNA を利用し、単離又は合成することができる。本発明のタンパク質の取得方法については後記する。

## (2) 本発明の DNA の態様

本発明の DNA は、下記の (i) から (i v) の何れかの DNA に関する。

(i) 上記した本発明のタンパク質をコードする DNA。

(i i) 配列番号 22 ～ 配列番号 25 の何れかに記載の塩基配列を有する DNA。

(i i i) 下記の何れかの DNA。

(1) 配列番号 2、配列番号 16、又は配列番号 18 に記載の塩基配列を有する DNA；又は

(2) 配列番号 2、配列番号 16、又は配列番号 18 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、



かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は  
(3) 配列番号2、配列番号1.6、又は配列番号18に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

(iv) 下記の何れかのDNA。

(1) 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～8553番目の塩基配列又は配列番号15に記載の塩基配列の812番目～3002番目の塩基配列を有するDNA；又は

(2) 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～8553番目の塩基配列又は配列番号15に記載の塩基配列の812番目～3002番目の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は

(3) 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～8553番目の塩基配列又は配列番号15に記載の塩基配列の812番目～3002番目の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

(v) 下記の何れかのDNA。

(1) 配列番号1又は配列番号15に記載の塩基配列を有するDNA；又は

(2) 配列番号1又は配列番号15に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は

(3) 配列番号1又は配列番号15に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

本明細書では、本発明のDNAを、本発明の遺伝子と称する場合もある。

配列番号1で示される塩基配列は、8553個の塩基から成るゲノムDNA塩基配列であり、配列番号2で示される塩基配列は、配列番号1より得られたコー

ド配列である。配列番号 3 は、配列番号 2 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列である。

配列番号 15 で示される塩基配列は 3306 個の塩基から成るゲノム DNA 塩基配列であり、配列番号 16 で示される塩基配列は、配列番号 15 より得られたコード配列である。配列番号 17 は、配列番号 16 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列である。

本明細書において「1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列」とは、例えば 1 ～ 20 個、好ましくは 1 ～ 15 個、より好ましくは 1 ～ 10 個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個の任意の数の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列のことを言う。

本明細書において、「1 から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列」とは、例えば 1 ～ 20 個、好ましくは 1 ～ 15 個、より好ましくは 1 ～ 10 個、さらに好ましくは 1 ～ 5 個の任意の数のアミノ酸が欠失、付加または置換されているアミノ酸配列のことを言う。

本明細書において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA」とは、DNA をプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA の塩基配列を意味し、例えば、コロニーあるいはブランク由来の DNA または該 DNA の断片を固定化したフィルターを用いて、0.7 ～ 1.0 M の NaCl 存在下 65℃ でハイブリダイゼーションを行った後、0.1 ～ 2 × SSC 溶液（1 × SSC の組成は、150 mM 塩化ナトリウム、15 mM クエン酸ナトリウム）を用い、65℃ 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA 等を挙げることができる。

ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後“モレキュラークローニング第 2 版”と略す）等に記載されている方法に準じて行うことができる。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、プローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられる。ここで言う一定以上の相同性とは、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上である。なお、ここで言う一定以上の相同性を有するDNAとしては、上記した相同性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドの両方を包含する。

本発明のDNAは、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与することができるDNAである。より具体的には、本発明のDNAを導入した形質転換植物（Rf系統）を細胞質雄性不稔系統（cms系統）の個体と交配させることにより、稔性の回復されたF1種子を得ることができる。上記cms系統の個体として好ましくは、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子が導入された個体が挙げられる。

### （3）本発明のDNAの取得方法

本発明のDNAの取得方法は特に限定されない。本明細書中に開示した配列番号1または配列番号2に記載の塩基配列、並びに配列番号3に記載したアミノ酸配列または配列番号3に記載したアミノ酸配列の情報に基づいて得られたPPRモチーフやミトコンドリア移行配列を組み合わせ得られるアミノ酸配列の情報に基づいて、当業者に公知の一般的育種手法及び一般的遺伝子工学的手法を利用することにより、本発明のDNAを単離又は合成することができる。

具体的には、本発明の遺伝子が発現される適当な植物起源、具体的にはダイコンの品種や近縁種を含む*Raphanus*属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物から細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが移入されたその他の植物、より具体的にはコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン又はこれらのダイコンの品種や近縁種等の*Raphanus*属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲ

ノムDNAが移入されたブラシカ属の植物から得ることができ、例えば、R f 遺伝子の近傍に位置するDNAマーカートを単離し、このDNAマーカートとR f 遺伝子の遺伝距離の関係を示したゲノムの地図を作製し、ゲノムの地図を出発点としてR f 領域のポジショナルクローニング法(クロモゾームウォーキングとも言う)によって、本発明の遺伝子を単離、取得できる。

この手法はゲノムDNA上に適当なDNAマーカートを見だし、R f 遺伝子とDNAマーカートの遺伝距離を測ることでゲノムの地図を作製することから始める。DNAマーカートは父親由来のゲノムと母親由来のゲノムとを識別する必要があり、一般的には数100bpの長さからなる。またDNAマーカートは遺伝子と同一染色体上に座乗している必要があり、遺伝子との距離が近いために遺伝様式がほぼ同様となるようなもの、つまり遺伝的に強く連鎖しているマーカートほど望ましい。

DNAマーカート単離法には、以前よりRFLP法が使われていたが、近年はPCRを用いた簡便な方法であるRAPD法やAFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法 (Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.21, 4407-4414) が利用されている。特に、AFLP法は遺伝的に強く連鎖するマーカートを得る手段として有効である。マーカートとの遺伝距離を測る材料として、通常、R f 1 遺伝子を持たない劣性ホモ個体とR f 1 遺伝子をホモに有する優性ホモ個体を交配したF1世代を自家受粉して得られるF2集団やF1世代とこの親である目的の遺伝子を持たない劣性ホモ個体を交配して得られるBC1集団を用いることができる。

上記劣性ホモ個体としては、細胞質雄性不稔系統のダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属植物、より具体的には細胞質雄性不稔系統のコセナダイコンやオグラダイコン、又は、コセナダイコン由来の細胞質雄性不稔(コセナcms)やオグラダイコン由来の細胞質雄性不稔(オグラcms)が移入されたブラシカ属植物、より具体的にはcmsナタネを使用することができる。

上記優性ホモ個体としては、R f 系統であるダイコンの品種、近縁種を含むRaphanus属の植物、より具体的には細胞質雄性不稔回復系統のコセナダイ

コン、オグラダイコン、園紅ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含む *Raphanus* 属植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的には *Rf* ナタネを使用することができる。

これらの両親を交配して得られたF1世代を自家受粉して得られるF2集団や、F1世代と劣性ホモ個体を交配して得られるBC1集団は、通常は100個体以上、より好ましくは1000個体以上解析することが望ましく、個体数が増すほどゲノムの地図の精度が上がり、DNAマーカーから目的の遺伝子までの物理的距離が短くなる。*Rf* 遺伝子の場合も同様に、より物理的距離が短いDNAマーカーを得ることが可能になる。

DNAマーカーと*Rf* 遺伝子の遺伝距離を測る材料としては、例えば、cms系統コセナダイコン (*Raphanus sativus* cv. Kosena) と *Rf* 系統である園紅ダイコン (*Raphanus sativus* cv. Yuanhong) とを N. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000 に記載の方法に準じ、交配したダイコンF1世代を自家受粉して得られる数千個のF2集団を用いることができる。これらを解析することにより、*Rf* 遺伝子を挟むような形で、両側にそれぞれ0.2cM程度の遺伝距離で離れた位置に連鎖するDNAマーカーを単離することができ、これにより図1に示すようなマーカーと*Rf* 遺伝子の遺伝距離を示したゲノムの地図を作成することができる。

ゲノムの地図作成に続いては、その位置に対応するゲノムDNAをクローン化し、目的の遺伝子を挟むDNAマーカー間を繋ぐことが必要になる。通常はDNAマーカーと目的遺伝子との物理距離が離れているため、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋げることによって、DNAマーカーから目的遺伝子領域をカバーすることになる。このDNAマーカー間を、ゲノムDNA断片を持つクローンで繋ぐ行程がコンティグの作製である。*Rf* 遺伝子の場合も同様に、より*Rf* 遺伝子に近い位置に存在するDNAマーカー間を、*Rf* 遺伝子領域をカバーするように、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋ぐことによってコンティ

グを作製することができる。

ゲノムDNA断片をもつクローンの集合体はゲノミックライブラリーを作製することで得られる。通常は、クローニングできるゲノムDNAの長さによって、いくつかの種類のベクターが使用され、例えば、約20 kbまでの断片をクローニングできるラムダファージベクター、比較的長い断片（～40 kb）がクローニングできるコスミドベクター、より長い100 kb以上の断片をクローニングできるBAC（Bacterial artificial chromosome）ベクター等を利用したライブラリーが挙げられる。

いずれのライブラリーも、クローニングされた断片の平均長にライブラリーの集団数を乗じた値が、ライブラリーに供与されたゲノムの全長（ゲノムサイズ）に対して4から5倍程度の値に成ることが重要である。ダイコンのゲノムサイズは約500 Mbpと考えられているので、ラムダファージベクターで平均長20 kbの場合、集団数は $1.0 \times 10^5$ 個から $1.25 \times 10^5$ 個となり、コスミドライブラリーで平均長が40 kbの場合は、集団数は $5.0 \times 10^4$ 個から $6.25 \times 10^4$ 個となる。ナタネのゲノムサイズは約1000 Mbpと考えられているので、ラムダファージベクターで平均長20 kbの場合、集団数は $2.0 \times 10^5$ 個から $2.5 \times 10^5$ 個となり、コスミドライブラリーで平均長が40 kbの場合は、集団数は $1.0 \times 10^5$ 個から $1.25 \times 10^5$ 個となる。

ライブラリーに供与するゲノムDNAは、目的の遺伝子を含む生物からゲノムDNAを常法により抽出すればよい。Rf遺伝子の場合、Rf系統であるダイコンの品種、近縁種を含む*Raphanus*属の植物、より具体的には細胞質雄性不稔回復系統のコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン、又は、これらのダイコンの品種や近縁種を含む*Raphanus*属植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノムDNAが交配や細胞融合の手法により移入されたブラシカ属の植物、より具体的にはRfナタネが利用できる。一般的には、F<sub>2</sub>集団やBC<sub>1</sub>集団を作製した時に利用した親と同じRf系統の植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリーを作製することが最も望ましいと考えられる。ゲ

ノムDNAはCTAB法 (Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321) のような常法に従い、調製することができる。

コンティグの作製は最初に、R f 遺伝子の両側に位置するDNAマーカーを保持するクローンを単離する。ゲノミックライブラリーから、常法により、ラムダファージライブラリーの場合は、プラークハイブリダイゼーション法を用いて、コスミドライブラリーとBACライブラリーの場合はコロニーハイブリダイゼーション法を用いて単離する。次にその単離したクローンの末端領域を指標にして、そのクローンに隣接するクローンを単離する事によってコンティグを作製する。作成後、コンティグの塩基配列を、常法により決定する。

近年のゲノムプロジェクトの進展から、ゲノムDNAの塩基配列から機能する遺伝子を推定する技術が発達してきた。「Genscan」に代表される遺伝子発見プログラムは、かなりの確度で遺伝子を推定することができる。また「BLAST」に代表されるホモロジー検索プログラムは、他の遺伝子やタンパク質の類似性を推定することができる。この様な解析ソフトウェアを利用して、目的の遺伝子を推定し、単離することが行われている。R f 遺伝子の場合も、同様にコンティグのゲノムDNA配列を同様の解析ソフトウェアを利用して、単離、同定することが可能である。また解析すると、ゲノムDNA塩基配列上のプロモーター部分、イントロンを含んだ構造遺伝子部分、ターミネーター部分が明示される。また同時に、イントロンを含んだ構造遺伝子に対して、イントロンが除かれたタンパク質に翻訳される形の遺伝子とその遺伝子に対するアミノ酸配列が明示される。この様にしてコンティグ上のR f 遺伝子をかなりの確度で推定することが可能である。

また、上記解析ソフトを利用し推定された遺伝子配列を元にして、生体内で目的のゲノムが実際にはどのような形で発現しているかどうかを確認するために、mRNAを精製し、これに対する相補DNA(cDNA)を単離することで証明できる。また、どこから転写が開始しているかについては簡便法としては5'-RACE法と呼ばれるPCRを応用した方法やより確実にはプライマーエクステンション法やS1マッピング法をもちいて解析することで証明することが可能である。

以上の方法は、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 等に記載されている。

上述の手法で推定される塩基配列を元にして、単離された本発明の遺伝子としては、具体的には、配列番号 2、配列番号 16、又は配列番号 18 で示される DNA が挙げられ、これにより、該 DNA 配列をもとに、一般的な遺伝子工学的手法によって、他の植物起源等から cDNA を容易に単離することも可能となった。

具体的には、本発明の遺伝子が発現される適当な植物起源、具体的にはダイコンの品種や近縁種を含む *Raphanus* 属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物から細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノム DNA が移入されたその他の植物、より具体的にはコセナダイコン、オグラダイコン、園紅ダイコン又はこれらのダイコンの品種や近縁種等の *Raphanus* 属の植物又は交配や細胞融合の手法によりこれらの植物の細胞質雄性不稔回復遺伝子を含んだゲノム DNA が移入されたブラシカ属の植物から、常法に従って cDNA ライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明の遺伝子に特有の適当な DNA 断片をプローブとして、又は本発明の遺伝子の翻訳産物に対する抗体を用いて所望のクローンを選抜することにより、本発明の遺伝子に相当する cDNA を単離することができる。

上記において、cDNA の起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞が例示される。また、これらからの全 RNA の分離、mRNA の分離や精製、cDNA の取得とそのクローニングなどはいずれも常法に従って実施することができる。

本発明の遺伝子を cDNA ライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。

ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成された DNA などが一般的に使用できるが、すでに取得された本発明の遺伝子やその断片も良好に使用できる。また、本発明の遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンスプライマー、アンチセンスプライマーをスク



リーニング用プローブとして用いることもできる。

前記プローブとして用いられるセンスプライマーとアンチセンスプライマーのヌクレオチド配列は、配列番号 3、配列番号 17、又は配列番号 19 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA に対応する部分ヌクレオチド配列であって、少なくとも 15 個～50 の連続した塩基、好ましくは 20～30 個の連続した塩基を有するものが挙げられる。あるいは前記配列を有する陽性クローンそれ自体をプローブとして用いることもできる。

本発明の遺伝子の取得に際しては、PCR 法による DNA/RNA 増幅法や 5' - RACE 法等に代表される RACE 法等、遺伝子の単離に通常用いられる手法を組み合わせればよい。

かかる PCR 法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされた本発明の遺伝子の配列情報に基づいて適時設定でき、これは常法に従って合成できる。なお、増幅させた DNA/RNA 断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法などで行うことができる。

また、上記で得られる本発明の遺伝子あるいは各種 DNA 断片は、常法に従って、その塩基配列を決定することができる。

このようにして得られる本発明の遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明遺伝子の存在と発現の有無を特徴的に検出することができる。

前述した通り、本発明の遺伝子としては、例えば配列番号 3、配列番号 17、又は配列番号 19 に示されるアミノ酸配列をコードする DNA を挙げることができるが、特にこれに限定されることなく、当該遺伝子の相同物も包含される。

ここで遺伝子の相同物とは、本発明遺伝子（またはその遺伝子産物）と配列相同性を有し、上記構造的特徴、および上記したようなその生物学的機能の類似性により一つの遺伝子ファミリーと認識される一連の関連遺伝子を意味し、該遺伝子の対立遺伝子も当然含まれる。

例えば、本発明の遺伝子は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 で示される特定の

塩基配列を有する遺伝子に限らず、配列番号 3 で示した各アミノ酸残基に対する任意のコドンを組み合わせて選択した塩基配列を有することも可能である。同様に、配列番号 15 もしくは配列番号 16 で示される特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、配列番号 17 で示した各アミノ酸残基に対する任意のコドンを組み合わせて選択した塩基配列を有することも可能であり、配列番号 18 で示される特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、配列番号 19 で示した各アミノ酸残基に対する任意のコドンを組み合わせて選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度などを考慮することができる。

また、前記の通り、本発明の遺伝子は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 18 又はそれらの一部に示される塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA をも包含する。このような DNA は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 18 又はそれらの一部に示される塩基配列を有する DNA と一定以上の相同性を有する DNA である。

上記した一定以上の相同性を有する DNA とは、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 18 で示される塩基配列又はそれらの一部あるいは配列番号 3、配列番号 17 又は配列番号 19 で示されるアミノ酸配列又はその一部をコードする塩基配列と少なくとも 70% の同一性、好ましくは少なくとも 90% の同一性、より好ましくは少なくとも 95%、さらにもっとも好ましくは少なくとも 97% の同一性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドを言う。

より具体的には、例えば、0.1% SDS を含む 0.2×SSC 中 50℃ または 0.1% SDS を含む 1×SSC 中 60℃ のストリンジェントな条件下で、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 15、配列番号 16 又は配列番号 18 に示される塩基配列又はそれらの一部の塩基配列を有する DNA とハイブリダイズする塩基配列を有する DNA を例示することができる。

また、本発明のDNAのうち、特に、

配列番号1又は配列番号15に記載の塩基配列又はその一部において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；

配列番号2、配列番号16又は配列番号18に記載の塩基配列又はその一部において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；及び

配列番号3、配列番号17又は配列番号19に記載のアミノ酸配列又はその一部において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質をコードするDNA；

については、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発などの当業者に既知の任意の方法で作製することができる。例えば、配列番号1、2、15、16、又は18に記載の塩基配列またはそれらの一部の塩基配列を有するDNAを利用し、これらDNAに変異を導入することにより変異遺伝子を取得することができる。

変異遺伝子を得るための方法として、例えばランダム突然変異体、標的のある突然変異体、合成遺伝子を用いた方法など（新遺伝子工学ハンドブック、実験医学 別冊、羊土社、1996参照）等の公知の方法を用いることができる。

具体的には、配列番号1又は2の塩基配列又はそれらの一部の塩基配列を有するDNAに対し、変異原となる薬剤と接触作用させる方法、紫外線を照射する方法、遺伝子工学的手法等を用いて行うことができる。遺伝子工学的手法の一つである部位特異的変異誘発法は特定の位置に特定の変異を導入できる手法であることから有用であり、モレキュラークローニング第2版等に記載の方法に準じて行うことができる。

#### （4）本発明のDNAを含有するベクター

本発明のDNAは適当なベクター中に組み込んで組み換えベクターとして使用することができる。ベクターの種類は発現ベクターでも非発現ベクターでもよく、目的に応じて選ぶことができる。

クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものが好ましく、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、Lambda ZAP II(ストラタジーン社製)、 $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49(1985)]、 $\lambda$ TriplEx(クローンテック社製)、 $\lambda$ ExCell(ファルマシア社製)、pT7T318U(ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218(和光純薬社製)、pUC118(宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

発現ベクターは宿主との組み合わせを考えて選択することができ、好ましくは宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、本発明の遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

細菌用の発現ベクターとしては、例えば、pBTrP2、pBTac1、pBTac2(いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2(Pharmacia社製)、pSE280(Invitrogen社製)、pGEMEX-1(Promega社製)、pQE-8(QIAGEN社製)、pQE-30(QIAGEN社製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669(1984)]、PLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製)、pTrS30(FERMBP-5407)、pTrS32(FERM BP-5408)、

pGEX (Pharmacia社製)、pET-3 (Novagen社製)、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pSTV29 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭63-233798)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等を例示することができる。細菌用のプロモーターとしては、例えば、trpプロモーター(P trp)、lacプロモーター(P lac)、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等を挙げるることができる。

酵母用の発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、Ycp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。酵母用のプロモーターとしては、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げるることができる。

動物細胞用の発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNAI/AmP (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210等を例示することができる。動物細胞用のプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等を挙げるができる。

植物細胞用の発現ベクターとしては、例えば、pIG121-Hm [Plant Cell Report, 15, 809-814 (1995)]、pBI121 [EMBO J. 6, 3901-3907 (1987)]、pLAN411やpLAN421 (Plant Cell Reports 10 (1991) 286-290) を例示することができる。また、特に

10kb以上の長いDNA断片を植物に導入するときは、長鎖DNAを安定的に保持・導入できるように改良されたベクターの使用が望ましい。例えば、pBIBAC2 (Gene 200 (1997) 107-116)、pYLAC7 (PNAS 96 (1999) 6535-6540) やpBGRZ2 (バイオサイエンスとインダストリー55 (1997) 37-39) があげられる。

植物細胞用のプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス 3' 5' S プロモーター [Mol. Gen. Genet (1990) 220, 389-392] 等が挙げられる。なお、植物の形質転換についての詳細は別途後述する。

#### (5) 本発明のDNAを有する形質転換体

本発明のDNAを有する形質転換体は、上記した組み換えベクター（好ましくは発現ベクター）を宿主に導入することにより作製することができる。

細菌の宿主細胞の具体例としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができる。細菌宿主へ組換えベクターを導入する方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法やプロトプラスト法等を挙げることができる。

酵母宿主の具体例としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シズサッカロミセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等を挙げることができる。

酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、

スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

動物細胞宿主としては、ナマルバ細胞、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等を挙げることができる。

動物細胞への組み換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

植物細胞を用いた形質転換体については後述する。

#### (6) 本発明のタンパク質の取得方法

本発明のタンパク質の取得方法は特に限定されない。本明細書中に開示した配列番号3、配列番号17又は配列番号19に記載したアミノ酸配列又は配列番号3、配列番号17又は配列番号19に記載したアミノ酸配列の情報に基づいて得られるPPRモチーフやミトコンドリア移行配列を、組み合わせて得られるアミノ酸配列の情報に基づいて、当業者に一般的遺伝子工学的手法を利用することにより、本発明のタンパク質を単離、発現、又は合成することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNAを単離または合成して、細胞に導入することにより発現させることができる。

本発明のタンパク質は、例えば、本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養し、培養物中に本発明のタンパク質を生成蓄積させ、該培養物より該タンパク質を採取することにより取得することができる。

本発明の遺伝子を有する形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行うことが好ましく、培養温度は通常15～40℃であり、培養時間は、通

常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPM11640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501(1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396(1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下の条件下で1～7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、MS培地、R2P培地等、その植物種に応じて通常用いられる培地が用いられる。培養は、通常pH6～8、15～35℃等の条件下で1～21日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

形質転換体の培養物から、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する本発明のタンパク質を単離精製するには、通常のタンパク質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のタンパク質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常のタンパク質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース、DIAION HPA-75(三菱化学社製)等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィ



一法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該タンパク質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該タンパク質を回収後、該タンパク質の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該タンパク質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のタンパク質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該タンパク質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のタンパク質は、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced Chem Tech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin Elmer社製)、アマシャムファルマシアバイオテック(Amersham Pharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

#### (7) 本発明のDNAを有する植物の形質転換体

配列番号1及び配列番号15に記載された塩基配列は、植物ゲノム本来の塩基

配列を抜き出した形の塩基配列である。この塩基配列は、遺伝子の発現に必要なプロモーターとターミネーターを作動可能な形で含んでいる。導入するベクターは、直接導入法の場合は一般的なクローニングベクター、たとえばコスミドpWE15 (STRATAGENE社製) などに当該遺伝子をクローニングすることができる。アグロバクテリウムを利用する場合は、一般的な植物形質転換用ベクター、たとえばpBI121 (Clontec社製) などにクローニングすることができる。

また、この配列 (ゲノム配列) から一部のイントロンを抜き出した塩基配列のDNAや、ほとんどすべてのイントロンを抜き出した塩基配列のDNA、配列番号2又はその238～2064番目の塩基で示されるDNA、配列番号16又はその238～2064番目の塩基で示されるDNA、配列番号18又はその244～2073番目の塩基で示されるDNA、あるいは配列番号3又はその80～687残基に該当する部分、配列番号17又はその80～687残基に該当する部分、又は配列番号19又はその82～690残基に該当する部分で示されるタンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入してもよい。

ここで、配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～5091番目の塩基配列、又は配列番号15に記載の塩基配列の1番目～811番目の塩基配列を有するDNAは、薬でmRNAを転写する能力を有するプロモーターであり、雄性不稔性を回復させるのに好ましく用いられる。

さらに、プロモーターとターミネーター部分を既知の植物細胞中で機能するプロモーターやターミネーターと置換してもよい。

尚、上記した配列番号2又はその238～2064番目の塩基で示されるDNA、配列番号16又はその238～2064番目の塩基で示されるDNA、配列番号18又はその244～2073番目の塩基で示されるDNA、あるいは配列番号3又はその80～687残基に該当する部分、配列番号17又はその80～687残基に該当する部分、又は配列番号19又はその82～690残基に該当する部分で示されるタンパク質をコードするDNAを植物細胞に導入する場合には、このDNAの他にプロモーターとターミネーターが必要である。通常よく使

用される一般的な発現ベクターとしては、pBI121 (clonotec社製) が挙げられるが、このベクターはプロモーターにカリフラワーモザイクウイルスの 3'5Sプロモーター、ターミネーターに *A. tumefaciens* の Tiプラスミドに存在するノパリン合成酵素のターミネーターが使用されている。また発現に必要なプロモーターとしては、上記カリフラワーモザイクウイルスの 3'5Sプロモーターに限らずに、植物に広く存在する rbcSプロモーター等を用いてもよく、より好ましくは花粉の生育期に発現する種類のプロモーター例えばTA29プロモーターが、さらに好ましくは当該遺伝子上流に配位された本来のプロモーターが用いられる。ターミネーターについても、上記ノパリン合成酵素のターミネーターに限らず、カリフラワーモザイクウイルスの 3'5Sターミネーター等を用いることができ、より好ましくは当該遺伝子下流に配位された本来のターミネーターが用いられる。

加えて、上記した配列番号 2 又はその 238～2064 番目の塩基で示される DNA、配列番号 16 又はその 238～2064 番目の塩基で示される DNA、配列番号 18 又はその 244～2073 番目の塩基で示される DNA、あるいは配列番号 3 又はその 80～687 残基に該当する部分、配列番号 17 又はその 80～687 残基に該当する部分、又は配列番号 19 又はその 82～690 残基に該当する部分で示されるタンパク質をコードする DNA を用いて、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復させる目的に使用する場合、この配列に加え、ミトコンドリアへの移行配列が必要となる。

該ミトコンドリアへの移行配列としては、上記配列番号 2 の 1～237 番目の塩基で示される DNA 又は配列番号 3 の 1～79 番目のアミノ酸配列をコードする DNA、上記配列番号 16 の 1～237 番目の塩基で示される DNA 又は配列番号 17 の 1～79 番目のアミノ酸配列をコードする DNA、あるいは上記配列番号 18 の 1～243 番目の塩基で示される DNA 又は配列番号 19 の 1～81 番目のアミノ酸配列をコードする DNA、その他上述の公知の移行配列等が利用できる。

本発明者らは以下の実施例において、配列番号 1 に示された、ゲノムに存在す

る本来のプロモーターからターミネーターまでに含まれるイントロンを含んだRf遺伝子のDNAを、本来の形で植物に導入するために、植物形質転換用ベクターを作製した。コンティグの一部をなすクローンから配列番号1に示された塩基配列を制限酵素によって切り出した後、適当なクローニングベクターにサブクローニングした後、植物形質転換用ベクターpKM424, pBGRZ2にサブクローニングした断片を導入し、当該断片を植物に導入可能なベクターを得た。このベクターを植物形質転換用アグロバクテリウムに導入した。このベクターを保持したアグロバクテリウムを植物に感染させることによって当該DNA断片が植物ゲノム中に組み込まれる。

本発明の遺伝子が適用される植物は、例えばナタネ、ヒマワリ、ダイズ、パーム椰子等の油量作物、例えばイネ、トウモロコシ、コムギ等の禾穀類、例えば、タバコ、ペチュニア等の花卉類、例えばトマト、ブロッコリー、キャベツ、白菜、人参等の各種の野菜類などが例示される。

このうち、ナタネ、キャベツ、白菜、ブロッコリー等のブラシカ属の植物やトマトなどが好ましく、特に好ましくは、ナタネ、キャベツ、白菜、ブロッコリーが挙げられ、最も好ましくは、ナタネである。

本明細書において、形質転換植物源としては、種子、芽生え、苗、カルス、培養細胞、植物体などが挙げられ、例えば、ナタネの場合には芽生えまたはプロトプラスト；ダイズの場合には芽生え、カルスまたは培養細胞；ヒマワリの場合には芽生え；パーム椰子の場合にはカルスまたは培養細胞；イネの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；トウモロコシには、芽生え、苗、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；コムギの場合には、芽生え、カルスまたは培養細胞；キャベツ、ブロッコリーの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト；ニンジンの場合には、芽生え、カルス、培養細胞またはプロトプラスト等と言ったように、当業者が通常行うように、対象植物によって適宜好ましい部位を選択して行えばよい。

植物への形質転換法は常法に従って行うことができ、例えば、ベクターを一度

アグロバクテリウムに導入した後に、アグロバクテリウムを植物細胞に感染させることで、ベクターを植物に導入する方法や、エレクトロポレーション法、DEAEデキストラン法、リン酸カルシウム法、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法などを用いてベクターを細胞へ直接導入する方法等を挙げることができる。

例えば、ナタネの場合に好ましい遺伝子導入法としては、下記に記載された方法が挙げられる。

スクロース等の糖類を炭素源として含んだMS培地で無菌発芽させたナタネ品種の下胚軸を2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸、及びスクロースを含むMS培地上で前培養する。YEB培地で増殖させたアグロバクテリウムを遠心により集菌し、スクロースを含んだMS培地に再懸濁を行う。この懸濁液に、先のナタネ下胚軸を加え振とうさせた後、取り出した下胚軸を元の前培養培地に戻し3日間共存培養した後、ゼアチン、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモン、カルベニシリン、及びカナマイシンを含む選択培地に移して選抜を行う。これにより、得られた緑色の再生芽を、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモンを任意に含んだ伸長培地、引き続いてナフタレン酢酸、ベンジルアミノプリン等の植物ホルモンを任意に含んだ発根培地で培養することで再生個体を得ることができ、この個体をcms系統の個体と交配することにより、稔性が回復されたF1雑種を得ることができる。

このように植物に本発明のDNAを導入することにより、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することが可能になる。

尚、上記再生個体は、cms系統のナタネと交配し、その子孫の稔性を調査することで、発現の確認ができるが、cms細胞質を持つナタネを材料として形質転換を行った場合には、上記のように根を形成した形質転換体（再生個体）を通常の肥料を含む土壌に移し開花させることで、花粉稔性を調査でき、時間的にも操作的にも簡便で好ましい。

また、上記形質転換において、用いる細胞としてcms細胞質を有するナタネの細胞又は組織、好ましくは胚軸、子葉、葉、花粉、培養細胞、カルス、プロト

プラストを利用して上述のように形質転換を行った場合には、上記の方法で得られる植物体（再生個体）を通常の肥料を含む土壌に移し開花させることで、花粉稔性が回復された植物個体を得ることができる。

すなわち、c m s細胞を用い、該c m s細胞に上述の遺伝子導入法で本発明のDNAを導入し、該DNAが核に組み込まれている細胞をカナマイシン等の抗生物質耐性あるいは除草剤耐性選抜マーカーを指標にして選抜した後、前述のような伸長培地及び発根培地で培養することにより該DNAが核に組み込まれた植物体を得ることができる。この植物体は、雄性不稔形質が回復され可稔となる。

細胞質雄性不稔回復に関与する遺伝子を検出する方法としては、請求項1から4の何れかに記載のDNAから任意に設定した15～50merのオリゴヌクレオチドプライマー、又は、請求項1から4の何れかに記載のDNAの全部又は1部からなる少なくとも15mer以上のプローブを使用し、目的の生物試料中に、該プライマーにより増幅される塩基配列の量、又は、プローブにより検出される塩基配列の量が、1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認することにより行うことができる。

具体的な確認手法としては、例えば、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法などがあげられ、このうち、PCR法が好ましい。これらの手法は、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989. 以後“モレキュラークロニング第2版”と略す）等に記載されている方法に準じて行うことができる。

1ゲノム中に1遺伝子以上あることを確認するためには、PCR法では簡易法として同じコピー数のDNAを鋳型にして、同程度の増幅が認められることが必要であり、より正確には定量PCR法を用いて、内部標準として1ゲノム中に1遺伝子存在することがわかっている既知の遺伝子を増幅させる任意のプライマーを用い、同量の生物試料中に、この既知の遺伝子の増幅量と該プライマーにより増幅される塩基配列の量を比較することで確認できる。サザンハイブリダイゼーション法では、当該DNAが1ゲノム中に1遺伝子あることがわかっている稔性

回復系統植物個体のDNAと目的の植物試料のDNAを等量ずつ比較して、検出されるDNAの量が同じ又はそれ以上であることを確認する。

PCR法に用いるプライマーは、たとえば配列番号1もしくは配列番号2に記載のDNA配列と同一の、または相補性を有する15～50merのオリゴヌクレオチドがあげられる。

サザンハイブリダイゼーション法に用いるプローブは、配列番号1もしくは配列番号2に記載のDNA配列と同一の2本鎖DNAの全域もしくは少なくとも15mer以上のその一部分、または1本鎖DNAまたはその相補鎖の全域もしくは少なくとも15mer以上のその一部分があげられる。また、先に述べたようにプローブとして使用するDNAの塩基配列と一定以上の相同性を有するDNAが挙げられる。ここで言う一定以上の相同性とは、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは97%以上である。なお、ここで言う一定以上の相同性を有するDNAとしては、上記した相同性を有するポリヌクレオチドおよびその相補鎖ポリヌクレオチドの両方を包含する。

以上に述べた遺伝子を検出する方法は、形質転換体において当該DNAが組み込まれているかどうかを確認することだけでなく、交配によりRf遺伝子の導入を試みた個体においても、Rf遺伝子の有無を確認する手段として用いることができる。この方法を用いれば、細胞質雄性不稔個体にRf遺伝子を導入した場合、開花する前にRf遺伝子の有無を確認することが可能である。また、通常の細胞質を持つ個体にRf遺伝子を導入した場合は、開花時の花粉を細胞質雄性不稔個体に交配して得られた次世代の個体の稔性を確認しなければならないが、この方法を用いることでこれ以前にRf遺伝子の有無を確認できる。このような利用方法は、一般的にマーカーDNAの利用またはマーカーDNA育種と呼ばれている。Rf遺伝子の場合は、Rf遺伝子のマーカーDNA（Rfマーカー）としての利用が考えられる。Rfマーカーは、先に述べたように、当該DNAを導入した組み換え個体や非組み換え体である交配によりRf遺伝子を導入した植物を母本

として用い、実用品種を育種していく上で、重要である。

尚、導入DNAがRf遺伝子として機能するかどうかを確認するには、上述のように形質転換体の稔性回復を確認することによっても可能であるが、その他にも、下記に示すような方法でも行うことができる。

先に述べたように、Rf遺伝子は、cms原因タンパク質であるORF125またはORF138タンパク質のミトコンドリア内の蓄積量を減少させることにより、植物体の稔性を回復させる。従って形質転換個体のミトコンドリアにおいて、ORF125またはORF138タンパク質蓄積量の減少を確認することにより、導入遺伝子がRf遺伝子であることが確認できる。

ミトコンドリアにおけるORF125またはORF138タンパク質蓄積量の減少を確認する方法としては、本明細書に記述した条件に従ってウェスタンブロッティング法によりORF125またはORF138タンパク質を検出した時に、内部標準として用いるミトコンドリアゲノム由来のタンパク質に対する抗体、例えば、N. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955, 2000に記載されている、抗F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>ATPase（以下ATPAと省略）のシグナル量が、細胞質雄性不稔個体と、稔性回復個体または細胞質雄性不稔個体に該DNAを導入した形質転換個体とで等量であって、かつ、細胞質雄性不稔個体のORF125またはORF138タンパク質の蓄積量と比べて、稔性回復個体または細胞質雄性不稔個体に該DNAを導入した形質転換個体での蓄積量が50%より多く減少、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上減少していることを確認する方法である。

実際には、ORF125を有する細胞質雄性不稔ダイコンのつぼみでは、稔性回復遺伝子Rfが導入されると、ORF125タンパク質の蓄積量は激減し、ほとんど検出されない。またナタネでは、細胞質ORF125を有する細胞質雄性不稔ナタネに、交配により稔性回復遺伝子が導入された稔性回復ナタネのつぼみでは、ORF125タンパク質の蓄積量が80%以上減少していることが観察されている。また、実施例においても、細胞質雄性不稔個体に当該DNAを導入した形質転換ナタネのつぼみでは、ORF125タンパク質の蓄積量が80%以上減少して



いることが観察されている。

尚、上述の方法における、ORF 125やORF 138タンパク質に対する抗体は、下記のような一般的な手法を用いることにより得ることができる。すなわち、抗原としてこれらのタンパク質を動物に免疫することで抗血清が得られ、さらにproteinAを結合したアフィニティーカラムを用いることでイムノグロブリンG抗体を精製することが出来る。用いる抗原としては、発現している細胞質雄性不稔植物やこの培養細胞から、定法によりタンパク質を精製する事で得られる。また、ORF 125やORF 138遺伝子を発現ベクターに繋いで、大腸菌や酵母において発現させ、同様に精製することで得られる。さらには、ORF 125やORF 138の全長もしくは一部分を化学合成したペプチドも抗原としてもちいる事ができる。ATPAに対する抗体も同様の手法で得ることができる。

さらに、cms細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞に、さらに誘導型プロモーターと共に本発明の遺伝子の一部又は全部を導入することで、本発明のDNAの発現を特異的にしかも一時的に制御することで、ハイブリッド種子生産に必要な雄性不稔性維持系統（維持系統）を必要としない新しいハイブリッド種子生産システムを作ることができる。

すなわち、通常、cms系統のナタネは不稔であるため、cms系統を増殖、維持するためには、別途、cms及びRfが関与していない維持系統というものが必要であり、従来、ハイブリッド種子の生産のためにはRf系統、cms系統、維持系統という3つの系統の植物を必要としたが、本発明により、Rf遺伝子が単離・同定されたため、ハイブリッド生産の際に、化学物質によるプロモーターの誘導を行い、回復遺伝子の発現を制御する方法を用いることにより、維持系統が無くとも増殖、維持が可能となるcms系統が構築できる。

具体的には、外部から誘導するプロモーター、例えば、薬剤感受性のあるプロモーターを有するベクターに、本発明の遺伝子の一部または全長をアンチセンスあるいはセンスの向きで組み込み、該ベクターを用いて、cms細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞を形質転換する。

c m s 細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞としては、上述の方法に従い、c m s 細胞質を有する細胞を本発明のDNAで形質転換したものだけでなく、c m s 系統とR f 系等を交配して得られたものでもよい。

上述の誘導可能なプロモーターとしては、例えば、特開平6-46697号公報で知られており、ベクターの作成及び形質転換の方法としては上述と同様の手法が挙げられる。

上記方法により得られるc m s 細胞質を有し、かつ、本発明のDNAを有する細胞であって、さらに誘導型プロモーターと共に本発明のDNAの一部又は全部が組み込まれた形質転換体は、通常、プロモーターが誘導されていないため、元々存在するR f 遺伝子により植物は可稔性を示し、該系統の維持も自家受粉により行うことができるが、ハイブリッド生産の際には、この植物にプロモーターを誘導させる能力を有する化学物質を作用させ、プロモーターが誘導されることによりR f 遺伝子の発現が阻害される。これにより、その植物は雄性不稔となるため、ハイブリッド種子生産時にc m s 系統として使用することができる。

従って、この方法を用いることで、c m s 系統であっても増殖、維持が自家受粉で行えることになるので、従来はハイブリッド種子の生産のために3つの系統が必要であったものが、維持系統は必要なくなり、生産コストを大幅に減少させることが可能になる。

なお、本出願の優先権主張の基礎となる出願である特願2001-128008号、特願2001-202082号及び特願2002-20083号の各明細書に開示した内容は全て引用により本明細書に開示したものとする。

以下、実施例について更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら限定されるものではない。

## 実施例

実施例1：細胞質雄性不稔回復遺伝子に連鎖するDNAマーカーの単離とゲノム地図の作製

稔性回復遺伝子 (R f 遺伝子) を単離するために、まず、R f 遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーを単離し、このDNAマーカーとR f 遺伝子の遺伝距離の関係を示したゲノムの地図を作製する必要がある。その出発点としてR f 領域のポジショナルクローニングを行った。

DNAマーカー単離法には、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 法 (Nucleic Acids Research, 1995, Vol.23, No.21 4407-4414) に準じた、GIBCO BRL社のAFLP Analysis System I AFLP Starter Primer Kitに従ってAFLPを行った。マーカーとの遺伝距離を測定する材料として、cms系統コセナダイコン (Raphanus sativus cv. Kosena) の1個体 (KC2/KA1)-1) とR f 系統である園紅ダイコン (Raphanus sativus cv. Yuanhong) の1個体 (Yuan10-3) とをN. Koizuka, et al. Theor Appl Genet, 100:949-955 2000に記載の方法に準じ、交配したダイコンF<sub>1</sub>世代8個体を自家受粉して得られた約2100個体のF<sub>2</sub>集団を用いた。その結果、R f 遺伝子を挟むような形で、両側にそれぞれ0.2~0.3cMの遺伝距離で離れた位置に連鎖するマーカーを5つ単離した。各DNAマーカーとR f 遺伝子の遺伝的距離を示したゲノムの地図を図1に示す。

## 実施例2：ゲノム地図を基にしたコンティグの作製とR f 遺伝子の解析

ゲノム地図作成に続いてはその位置に対応するゲノムDNAをクローン化し、R f 遺伝子を挟むDNAマーカー間を繋ぐ事が必要になる。ここで、DNAマーカーとR f 遺伝子との距離が離れているため、ゲノムDNA断片を持つクローンを複数個繋げる事によって、DNAマーカー間をカバーするR f 遺伝子領域のコンティグを作製した。

ゲノムDNA断片をもつクローンの集合体をゲノミックライブラリーといい、我々は2種類のライブラリーを作製した。DNA供与体として、F<sub>2</sub>集団を作製した時に利用した回復系統の親と同じ園紅ダイコンより、常法に従い、CTAB法 (Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Nucleic Acids Res., 8, 4321)

によりゲノムDNAを調製した。ライブラリーは、ラムダベクターとして $\lambda$  DASHIIベクター (STRATAGENE社製) を用いて、平均長20kb、集団数 $1.5 \times 10^5$ 個のラムダファージライブラリーを作製した。また、コスミドベクターとしてpWEB::TNCベクター (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を用いて、平均長40kb、集団数 $5.5 \times 10^4$ 個のコスミドライブラリーを作製した。

コンティグの作製は最初に、Rf遺伝子の両側に位置するDNAマーカを指標に、上記で作製したラムダファージライブラリーから、プラークハイブリダイゼーション法を用いて、ラムダクロンを単離した。またコスミドライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法を用いてコスミドクロンを単離し、図1に示すような両端のDNAマーカ間をカバーするコンティグを完成した。コンティグの一部を成すコスミドクロンNIT7/2とT03-2は常法により、塩基配列を決定した。

続いて、上記コンティグの一部を成すコスミドクロンNIT7/2とT03-2の塩基配列を、「Genscan」 (三菱スペースソフトウェア社製) を用いて、ダイコンとゲノムDNA配列が似通っており、最近全ゲノム配列が決定されたシロイヌナズナに対するパラメーターを加味して解析した。その結果、Rf遺伝子を発現すると思われるプロモーター部分とイントロンを含んだ構造遺伝子部分とターミネーター部分を発見した。さらに、イントロンが除かれたタンパク質に翻訳される形の遺伝子とその遺伝子に対するアミノ酸配列を得た。

### 実施例3：ゲノミックDNA領域のサブクローニング

「Genscan」で推定されたプロモーターからターミネーターを十分に含む、配列番号1に記載された1～8553の塩基配列からなるDNAのHpaI-SwaI断片(8546bp)を、フラグメント回収用アガロース (FMC社製) を用いたゲル電気泳動によりベクターと分離した。DNA断片を含むゲルをゲル分解酵素 (Epicentre Technologies社製) により消化してDNAを回収した。さらに、得られた断片を制限酵素BamHIにより切断したクローニング断片を得た。これらDNA断片を、pGEM-T easyベク

ター(Promega社製)にサブクローニングして、cds6BT/pGEM-T easyを得た。以下、詳細に記述する。

100  $\mu$  lの1 $\times$ K制限酵素緩衝液(20mM Tris-HCl (pH8.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM KCl)中に、1  $\mu$  gの NIT7/2コスミドDNAと10 unitの制限酵素HpaI (宝酒造社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cにて1時間加温した。

加温後、10  $\mu$  lの3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と250  $\mu$  lのエタノールを加えて攪拌後、-80 $^{\circ}$ Cにて5分間冷却して、15000rpm、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心する。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心する。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させる。回収したDNA沈殿に、滅菌水89  $\mu$  lを加えて溶かす。

溶かしたDNA溶液に、10  $\mu$  lの10 $\times$ H制限酵素緩衝液(500mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM NaCl)、1  $\mu$  lの10unit/ $\mu$  l制限酵素SwaI (宝酒造社製)を加え、25 $^{\circ}$ Cにて1時間加温した。11  $\mu$  lの10 $\times$ loading緩衝液(1% SDS, 50% Glycetrol, 0.05% Bromophenol Blue)を加えた。

1.2gの低融点アガロースSeaPlaqueGTG agarose (FMC社製)と、150mlの1 $\times$ TAE(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)緩衝液を混和後、100 $^{\circ}$ Cに加熱してアガロースを溶かし、45 $^{\circ}$ Cまで攪拌しながら冷却した。14 $\times$ 15cmのゲルトレイに30mm幅 $\times$ 1mm厚のコームを設置し、冷却したゲルを流し込み固めた。ゲルコームにloading Dyeを加えたDNAを流し込み、1 $\times$ TAE、30V/30cmの電圧で18時間電気泳動した。

電気泳動したゲルを、0.5  $\mu$  g/ml エチジウムブロミド/1 $\times$ TAE溶液に移し、30分染色した。ゲルを365nmの長波紫外線を放射したトランスイルミネーターの上に乗せ、目的の8546bpの断片を、滅菌したメスを用いて切り出した。さらにゲルを約1mm角の断片になるように刻み、あらかじめ秤量した2mlのマイクロチューブに移し、ゲルの重さを秤量した。

ゲルの重さ50mgに対して1  $\mu$  lの50 $\times$ GELase Buffer(2M Bis-Tris(pH6.0), 2M NaCl)を加えた。ゲルの入ったチューブを68 $^{\circ}$ Cに加温したドライヒートブロックに入れ、時々チューブを上下にしながら攪拌し、10分間加温して、ゲルを完全に

溶かした。このチューブを45℃のドライヒートブロックに移し、時々チューブを上下にしながら攪拌し、5分間加温した。このチューブに、ゲルの重さ200mgに対して1unitのGELase (Epicentre Technologies社製)を加えて45℃のドライヒートブロックで、時々チューブを上下にしながら攪拌し、30分間加温した。

ゲル容積に対して、1/3容量の10M 酢酸アンモニウム (pH7.0)を加え攪拌し、15000rpm, 5分間遠心した。上清を新しい2mlのマイクロチューブに移し、上に対して2容量のエタノールを加えた。チューブを攪拌後、15000rpm、4℃で20分間遠心した。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心した。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に20  $\mu$ l のTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かし、DNA断片を回収した。

回収した20  $\mu$ lのDNA溶液に、10  $\mu$ lの10×K制限酵素緩衝液(200mM Tris-HCl (pH8.5), 100mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Dithiothreitol, 1000mM KCl)、68  $\mu$ lのdH<sub>2</sub>O、2  $\mu$ lの10 unit/ $\mu$ lの制限酵素BamHI (宝酒造社製)を加え、30℃にて1時間加温した。加温後、10  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム (pH5.6)と250  $\mu$ lのエタノールを加えて攪拌後、-80℃にて5分間冷却して、15000rpm、4℃で15分間遠心する。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心する。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させる。回収したDNA沈殿に、滅菌水20  $\mu$ lを加えて溶かす。55  $\mu$ lの滅菌水、10  $\mu$ lの10x PCR 緩衝液(100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl)、6  $\mu$ lの25mM MgCl<sub>2</sub>、8  $\mu$ lの2.5mM dNTP mix、1  $\mu$ lの5 unit/ $\mu$ lのrTaq DNA polymerase (宝酒造社製)を加えて混和後、72℃で30分間加温して、3'末端にdATPを付加した。

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製)に、上記反応液を移し、5000rpm、4℃で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100  $\mu$ lの滅菌水を加えて、5000rpm、4℃で20分間遠心した。20  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)を加え、フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。3000rpm、4℃、5分間遠心して、フ

フィルターユニットのDNA を回収した。

上述の方法で得られた5  $\mu$  lの精製されたDNAに、1  $\mu$  lの50ng/ $\mu$  l pGEM-T easyベクター (Promega社製)、6  $\mu$  lのDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)のI溶液を混和後、16°Cで30分間インキュベートした。

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を100  $\mu$  lの滅菌水とともに移し、5000rpm、4°Cで20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100  $\mu$  lの滅菌水を加えて、5000rpm、4°Cで20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。

3000rpm、4°C、5分間遠心して、フィルターユニットのDNA を回収した。

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30  $\mu$  lのエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用 (電極間隔1mm) キュベット (USA Scientific Plastics社製) に、DNAと混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600 (BTX社製) を用いて、1.25kv、129  $\Omega$ 、50  $\mu$  Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37°Cに温めた500  $\mu$  lのSOC培地 (Gibco BRL社製) をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37°Cで1時間振とう培養した。100  $\mu$  g/mlのAmpiciline (和光純薬社製)、20  $\mu$  g/mlのX-Gal (宝酒造社製)、1mMのIPTG (宝酒造社製) を加えたLB寒天培地 (1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar) に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37°Cで培養した。

寒天培地上に現れた白いコロニーを、100  $\mu$  g/mlのAmpicillinを加えた2mlのLB培地にて、37°Cで18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAに目的の断片がクローニングされていることを制限酵素EcoRI (宝酒造社製) で切断して確認して、cds6BT/pGEM-T easyを得た。

上述の方法で得たcds6BT/pGEM-T easyを保持したそれぞれの大腸菌DH10Bを、100  $\mu$  g/mlのAmpicillinを加えた100mlのLB培地にて、37°Cで18時間培養した。ア

ルカリSDS法により、Qiagen Midiキット（キアゲン社製）を用いて精製した。

#### 実施例 4 - 1 : 植物形質転換用ベクターの作製(1)

cds6BT/pGEM-Teasyを制限酵素EcoRIで切断後、フラグメント回収用アガロースを用いたゲル電気泳動によりベクターと分離し、回収されたDNA断片を植物形質転換用ベクターpKM424（pKM424にCaMV35Sプロモーター：GUS gene：NOSターミネーターの断片を加えたベクターがpLAN421（Plant Cell Reports 10(1991) 286-290ベクター）のEcoRI部位にクローニングして、植物形質転換用ベクターcds6BT/pKM424とした。以下に詳細を示す。

100  $\mu$  lの1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl)中に、1  $\mu$  g のcds6BT/pGEM-Teasy DNAと10 unitの制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加え、37℃にて1時間加温した。

以下、上記のHpaI-SwaI断片を取り出した同様の方法で、cds6BT/pGEM-Teasyからcds6BTを含むEcoRI断片を分離回収した。

100  $\mu$  lの1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl)中に、1  $\mu$  gの植物形質転換用ベクターpKM424と10 unitの制限酵素EcoRI（宝酒造社製）を加え、37℃にて1時間加温した。加温後、100  $\mu$  lの1M Tris-HCl (pH8.0)と、1 unitのBacterial Alkaline Phosphatase(宝酒造社製)を加えて混和後、50℃で1時間加温して脱リン酸化した。

200  $\mu$  lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)で飽和したフェノール・クロロホルムを加え、激しく攪拌した。15000rpm、5分間遠心後、上清を新しいチューブに移す。同様の操作をもう一度繰り返し、タンパク質を取り除いた。20  $\mu$  lの3M酢酸ナトリウム (pH5.6)と500  $\mu$  lのエタノールを加えて攪拌後、-80℃にて5分間冷却して、15000rpm、4℃で15分間遠心した。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心した。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に100  $\mu$  lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かし、10ng/ $\mu$  lの濃度とした。



10  $\mu$ l の精製されたEcoRI断片、1  $\mu$ l の脱リン酸化されたpKM424ベクター、11  $\mu$ l のDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)I溶液を混和後、16°Cで30分間インキュベートした。

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を100  $\mu$ l の滅菌水とともに移し、5000rpm、4°Cで20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100  $\mu$ l の滅菌水を加えて、5000rpm、4°Cで20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。

3000rpm、4°C、5分間遠心して、フィルターユニットのDNA を回収した。

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30  $\mu$ l のエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用 (電極間隔1mm) キュベット (USA Scientific Plastics社製) に、DNA と混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600 (BTX社製) を用いて、1.25kv、129  $\Omega$ 、50  $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37°Cに温めた500  $\mu$ l のSOC培地 (Gibco BRL社製) をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37°Cで1時間振とう培養した。50  $\mu$ g/mlのSpectinomycin (Sigma社製) を加えたLB寒天培地 (1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar) に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37°Cで培養した。

寒天培地上に現れたコロニーを、50  $\mu$ g/mlのSpectinomycinを加えた2mlのLB培地にて、37°Cで18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAにBamHI部位からHpaI部位がクローニングされていることを制限酵素HindIII (宝酒造社製) で切断して確認し、cds6BT/pKM424とした。

cds6BT/pKM424を保持した大腸菌DH10Bを、50  $\mu$ g/mlのSpectinomycinを加えた250mlのLB培地にて、37°Cで18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット (キアゲン社) を用いて精製した。

## 実施例4-2：植物形質転換用ベクターの作製(2)

配列番号1に記載の塩基配列を十分に保持するラムダクロンCHI (図2参照、クローニング断片長約17kb) をマルチプルクローニング部位に存在する制限酵素NotI (宝酒造社製) で切断後、フラグメント回収用アガロースを用いたゲル電気泳動によりベクターと分離し、回収されたDNA断片を植物形質転換用ベクターpBGRZ2 (バイオサイエンスとインダストリー55(1997)37-39) のNotI部位にクローニングして、植物形質転換用ベクターCHI/pBGRZ2とした。以下に詳細を示す。

100  $\mu$ lの1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl, 0.01% BSA, 0.01% TritonX-100)中に、1  $\mu$ g のラムダクロンCHI DNAと10 unitの制限酵素NotI (宝酒造社製) を加え、37℃にて1時間加温した。以下、上記のHpaI-SwaI断片を取り出した同様の方法で、ラムダクロンCHIのNotI断片を分離回収した。

100  $\mu$ lの1×H制限酵素緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 100mM NaCl, 0.01% BSA, 0.01% TritonX-100)中に、1  $\mu$ gの植物形質転換用ベクターpBGRZ2と10 unitの制限酵素NotI (宝酒造社製) を加え、37℃にて1時間加温した。加温後、100  $\mu$ lの1M Tris-HCl(pH8.0)と、1 unitのBacterial Alkaline Phosphatase(宝酒造社製)を加えて混和後、50℃で1時間加温して脱リン酸化した。

200  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)で飽和したフェノール・クロロホルムを加え、激しく攪拌した。15000rpm、5分間遠心後、上清を新しいチューブに移す。同様の操作をもう一度繰り返し、タンパク質を取り除いた。20  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム(pH5.6)と500  $\mu$ lのエタノールを加えて攪拌後、-80℃にて5分間冷却して、15000rpm、4℃で15分間遠心した。上清を除き、さらに1mlの70%エタノールを静かに加え、15000rpm、4℃で5分間遠心した。上清を除き、遠心真空乾燥機を用いて、沈殿を5分間乾燥させた。沈殿に100  $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)を加え、完全に溶かし、10ng/ $\mu$ lの濃度とした。

10  $\mu$ lの精製されたNotI断片、1  $\mu$ lの脱リン酸化されたpBGRZ2ベクター、11  $\mu$ l

のDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)I溶液を混和後、16℃で30分間インキュベートした。

限外ろ過フィルターユニット:Microcon-50 (ミリポア社製) に、上記反応液を100  $\mu$  lの滅菌水とともに移し、5000rpm、4℃で20分間遠心した。トラップの水を捨て、再度100  $\mu$  lの滅菌水を加えて、5000rpm、4℃で20分間遠心した。フィルターユニットを取り外し、向きを逆さにして新しいマイクロチューブに装着した。

3000rpm、4℃、5分間遠心して、フィルターユニットのDNA を回収した。

回収したDNAをチューブごと氷上に立て冷却した。30  $\mu$  lのエレクトロポレーション用大腸菌DH10B (Gibco BRL社製) をチューブに入れ、軽く混ぜた。予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用(電極間隔1mm) キュベット(USA Scientific Plastics社製)に、DNA と混和した大腸菌を移した。Electro Cell Manipulator 600(BTX社製)を用いて、1.25kv、129  $\Omega$ 、50  $\mu$  Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに37℃に温めた500  $\mu$  lのSOC培地(Gibco BRL社製)をキュベットに加えた。大腸菌を10mlの培養チューブに移し、37℃で1時間振とう培養した。25  $\mu$  g/mlのKanamycin (和光純薬社製) を加えたLB寒天培地(1%Bacto-Tryptone, 0.5%Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar)に、培養した大腸菌を拡げ、18時間以上37℃で培養した。

寒天培地上に現れたコロニーを、25  $\mu$  g/mlのKanamycinを加えた2mlの LB培地にて、37℃で18時間以上培養した。培養した大腸菌から、定法によりプラスミドDNAを抽出した。プラスミドDNAに目的の断片がクローニングされていることを制限酵素HindIII(宝酒造社製)で切断して確認し、CHI/pBGRZ2とした。

CHI/pBGRZ2を保持した大腸菌DH10Bを、25  $\mu$  g/mlのKanamycinを加えた250ml のLB培地にて、37℃で18時間培養した。アルカリSDS法により、Qiagen Midiキット(キアゲン社)を用いて精製した。

#### 実施例5：アグロバクテリウムへの植物形質転換用ベクターの導入

アグロバクテリウムのコンピテントセルを調製し、実施例4-1及び4-2で

得られたcds6BT/pKM424ベクター及びCHI/pBGRZ2ベクターのそれぞれを、調製した植物形質転換用アグロバクテリウムEHA101に導入した。以下、詳細に示す。

アグロバクテリウムEHA101のエレクトロポレーション用コンピテントセルを以下の方法で作製した。アグロバクテリウムEHA101を、50  $\mu$ g/ml Kanamycin (和光純薬社製), 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (和光純薬社製) を加えたLB寒天培地上でストリークして、28°Cで24時間以上培養し、シングルコロニーを得た。50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicolを加えたLB培地20mlを50ml遠心管に入れ、直径1mm程度のコロニーを植菌し、28°Cで40時間振とう培養した。40時間後、遠心管の蓋を一度開閉して、さらに4時間同様に培養した。培養液を1500×g, 4°Cで遠心して集菌した。上清を捨てたチューブに40mlの氷冷した滅菌10%グリセロールを入れ、菌体を再懸濁し、1500×g, 4°Cで遠心して集菌した。この操作を2回繰り返した。得られた菌体に氷冷した500  $\mu$ lの滅菌10%グリセロールを加え、再懸濁した。滅菌したマイクロチューブに100  $\mu$ lずつ菌体を分注し、液体窒素で凍結後、-80°Cフリーザーに保存した。

アグロバクテリウムEHA101のエレクトロポレーション用コンピテントセルを氷水上で溶かした。予め冷やした1.5mlチューブに40  $\mu$ lのエレクトロコンピテントセルを入れ、それぞれ100ngのcds6BT/pKM424 又は、CHI/pBGRZ2のプラスミドDNAを加えて軽く混和した。

予め氷上で冷やしたエレクトロポレーション用 (電極間隔1mm) キュベット (USA Scientific Plastics社製) にDNA と混和したアグロバクテリウムを移す。Electro Cell Manipulator 600 (BTX社製) を用いて、1.44kv、129  $\Omega$ 、50  $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行い、その後直ちに30°Cに温めた500  $\mu$ lのSOC培地 (Gibco BRL社製) をキュベットに加えた。アグロバクテリウムを10mlの培養チューブに移し、30°Cで1時間振とう培養する。

cds6BT/pKM424ベクターを導入したアグロバクテリウムは50  $\mu$ g/ml Kanamycin (和光純薬社製), 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (和光純薬社製), 50  $\mu$ g/ml Spectinomycin (Sigma社製), 2.5  $\mu$ g/ml Tetracycline (Sigma社製) を加えたLB寒天

培地(1% Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast Extract, 1%NaCl, 1.5% Bacto-Agar)に、培養したアグロバクテリウムを拡げ、24時間以上28℃で培養した。

CHI/pBGRZ2ベクターを導入したアグロバクテリウムは50  $\mu$ g/ml Kanamycin (和光純薬社製), 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (和光純薬社製), 30  $\mu$ g/ml Hygromycin (Sigma社製)を加えたLB寒天培地に、培養したアグロバクテリウムを拡げ、24時間以上28℃で培養した。

寒天培地上に現れたコロニーを、それぞれのベクターごとに適合した上記の抗生物質を加えた2mlのLB培地にて、30℃で24時間以上培養した。培養したアグロバクテリウムから、定法によりプラスミドDNAを抽出し、cds6BT/pKM424ベクターもしくはCHI/pBGRZ2ベクターがアグロバクテリウムに導入されていることを制限酵素HindIII (宝酒造社製)で切断して確認した。確認されたクローンは、24時間培養した培養液に滅菌80%グリセロールを等量加えて混和後、-80℃に保存し、ナタネの形質転換に用いた。

#### 実施例6：ナタネ形質転換体の作製

ナタネへの形質転換は以下のように行った。ダイコン由来のcms原因遺伝子orf125をもつCMSナタネ (SW18) の種子を10%の次亜塩素酸溶液で滅菌処理し、ホルモンを含まないMS培地(T. Murashige and F. Skoog Physiol. Plant. 15: 485, 1962)で発芽させた。発芽後7日-14日の幼植物から胚軸部分だけを切り取り3-5mmの長さに切り分け、MS培地 (シグマ社 M5519) + しょ糖3% + 2, 4-D 1mg/l、アガロース (シグマ社、typeI) 0.4%で23度、12-16時間前培養した。このとき、保護培養のためにタバコ由来の細胞系統BY-2と共存培養を行った。

一方CHI/pBGRZ2を含むアグロバクテリウムを28℃で8-48時間培養し、OD<sub>600</sub>=1.0程度まで増殖させた。アグロバクテリウムの菌体は液体のMSホルモンフリー培地に懸濁した。切り分けた胚軸とこのアグロバクテリウム溶液を混ぜ合わせ、約20分共存培養した。共存培養後、アグロバクテリウムをろ紙で除去した胚軸

は例えばMS基本培地+B5ビタミン(シグマ社、M0404)+スクロース3%+2, 4-D 1mg/lの培地で2日間培養し、感染させた。感染後、MS基本培地+B5ビタミン+スクロース3%+2, 4-D 1mg/lに抗生物質カルベニシリン(ファイザー社、ゼオペンまたはGIBCO-BRL社 Carbenicillin disodium salts)を500mg/lの濃度で添加した除菌培地に胚軸を移植し、アグロバクテリウムを除去した。

上述の除菌培地で5日から1週間経過した後、胚軸はMS基本培地+B5ビタミン+スクロース1%+ベンジルアミノプリン3mg/l+カーベニシリン500mg/lに加え、硝酸銀5mg/l、また選抜用としてカナマイシン5-30mg/l(ナカライテスク社、カナマイシン硫酸塩)を添加した培地で14日-21日培養した。このとき緑色のカルスが出現する場合があるので、それらは速やかに次のステップの培地に植え替えた。

次のステップの培地としては例えばMS培地(シグマ社、M5519)+スクロース1%+ベンジルアミノプリン3mg/l+ゼアチン1mg/l+カーベニシリン500mg/l+カナマイシン5~30mg/lを含む選抜培地がある。切り口からカルス形成した胚軸をこの培地に移植し23℃で3週間培養し、その後緑のカルスが出現するまで3週間後ごとに3~5回移植を繰り返した。

緑のカルスは、見つけ次第胚軸から切り取り同じ組成の培地に移した。その後、緑色の部分だけを切り取って植えついで行くと1~30%の確率で不定芽が形成された。不定芽はその後B5基本培地(シグマ社、G5893)+スクロース3%+ベンジルアミノプリン1mg/lに移して育成したあとMS培地(シグマ社 M5519)+スクロース3%+ナフタレン酸0.1mg/l+ベンジルアミノプリン0.01mg/lを含む培地で発根させた。

#### 実施例7：形質転換体の解析(導入DNAの検出)

実施例6により得られた、つぼみを形成した形質転換体の1個体から葉を1枚取りキアゲン社のDNA単離キット(DNeasy plant mini)を用いてDNAを単離した。

PCR法を用いて、導入DNA断片の3カ所(a, b, c部位)について、検出した(結

果を図3に示す)。a部位は配列番号1の塩基配列3186bpから3753bpまでの568bpであり、フォワードプライマーとして「5'-GAAGCAAAAAAGAAAACGAGCAGAG-3'」(配列番号4)、リバープライマーとして「5'-CCAAAAATCCGAAATCCGAATAGAC-3'」(配列番号5)を使用した。b部位は配列番号1の塩基配列4869bpから5112bpまでの244bpであり、フォワードプライマーとして「5'-CTCGGCTCTGGGTTTAGTGA-3'」(配列番号6)、リバープライマーとして「5'-TCCACAAACCCTAGCCAACA-3'」(配列番号7)を使用した。c部位は配列番号1の塩基配列7766bpから8250bpまでの485bpであり、フォワードプライマーとして「5'-GCTTATGCTTCTCTGGTTTCGCCTC-3'」(配列番号8)、リバープライマーとして「5'-CTCAGTTTTCGTCACCTTACACAATGC-3'」(配列番号9)を使用した。

1 $\mu$ lの形質転換体DNA溶液(50ng/ $\mu$ l)に、12.1 $\mu$ lの滅菌水、2 $\mu$ lの10xPCR緩衝液(100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl)、1.2 $\mu$ lの25mM MgCl<sub>2</sub>、1.6 $\mu$ lの2.5mM dNTP mix、1 $\mu$ lの各部位の10 $\mu$ Mフォワードプライマー溶液、1 $\mu$ lの各部位の10 $\mu$ Mリバープライマー溶液、0.1 $\mu$ lの5 unit/ $\mu$ lのrTaq DNA polymerase(宝酒造社製)を加えて混和後、94°C40秒、55°C30秒、72°C1分のサイクルを35回繰り返す事によりDNAを増幅した。サーマルサイクラーは、UNOII(Biometra社製)を使用した。反応終了後、4% Nusive3:1 Agarose(FMC社製)/1 $\times$ TBE(89mM Tris-borate, 89mM boric acid, 2mM EDTA)緩衝液のゲル電気泳動により、増幅産物を確認した(図3を参照)。

その結果、a部位はこの形質転換ナタネには導入されていないことがわかった。残りの2カ所(b, c部位)は、ポジティブコントロールと同じ大きさの増幅産物が得られ、形質転換ナタネに当該DNAが組み込まれていることが確認された。

#### 実施例8:形質転換体の解析(cms原因タンパク質ORF125蓄積量の減少の確認)

実施例7と同じ個体のつぼみを1つ取り、CMSタンパクであるORF125の蓄積量の減少をウエスタンブロッティング法によって解析した。結果を図4に

示す。

(1) 形質転換個体からのタンパク質抽出

タンパク質の抽出法、ウエスタンブローディング法に関して、N. Koizukaら (Theor Appl Genet (2000) 100:949-955) の方法に準じて行った。

具体的には、得られた形質転換ナタネのつぼみ (長さ1mm) 1つと、100  $\mu$  lの氷冷したタンパク質抽出緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 2% (W/V) SDS) を氷冷した乳鉢に入れ、乳棒で磨り潰した。この液を、マイクロ遠心チューブに移し、15000rpm, 15分間, 4°Cで遠心した。遠心後、上澄み液を新しいマイクロ遠心チューブに移し、100°Cで5分間加熱した。再度15000rpm, 15分間, 4°Cで遠心し、上澄み液を新しいマイクロ遠心チューブに移し、SDS可溶性タンパク質溶液とした。ブラッドフォード法によるタンパク質定量キット (Bio-rad社製) を用いてSDS可溶性タンパク質溶液の濃度を測定した。これと平行して、細胞質雄性不稔系統のナタネと稔性回復系統のナタネのつぼみからも同様にSDS可溶性タンパク質溶液を抽出、濃度測定を行った。

(2) SDS-PAGE法によるタンパク質の分離とPVDF膜への転写：ウエスタンブローディング

7x10cm角の10%のSDSポリアクリルアミドゲルを用いて、1レーンあたり15  $\mu$  gのSDS可溶性タンパク質を乗せて電気泳動にて分離した。加えて、ORF 125タンパク質蓄積量の比較のため、細胞質雄性不稔系統のナタネの希釈系列も同様に乗せて分離した。電気泳動条件は10mAで1時間、15mAで1時間行った。電気泳動後、セミドライブローディング装置 (日本泳動社製) を用いて、PVDF膜 (ミリポア社製) にポリアクリルアミドゲル中のタンパク質を、100mA, 1時間の条件で転写した。

(3) 抗体を用いたタンパク質の検出：ウエスタンブローディング

タンパク質を転写したPVDF膜を、上下2枚に分割し、10mlのブロッキング溶液 (20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.05% Tween20, 5%スキムミルク) に移し、



1時間振とうして、ブロッキングした。上のPVDF膜でミトコンドリアタンパク質量のコントロールとしてATPAを、下のPVDF膜で細胞質雄性不稔関連タンパク質であるORF125をそれぞれ検出した。10mlの1次抗体反応液（10mlのブロッキング溶液に、ATPA検出用として100 $\mu$ lのATPAモノクローナル抗体を加え、ORF125検出用として2 $\mu$ lのORF125に対するウサギ抗血清を加えた（M. Iwabuchi et al. Plant Molecular Biology (1999)39:183-188)）に、PVDF膜を移し18時間振とうした。100mlのTTBS（20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.05% Tween20）にPVDF膜を移し、10分間振とうした。この操作を3回繰り返し過剰の1次抗体液を洗い流した。10mlの2次抗体反応液（10mlのブロッキング溶液に、ATPA検出用として10 $\mu$ lのパーオキシダーゼを付加したヤギ抗マウスIgG（Amersham社製）、ORF125検出用として10 $\mu$ lのアルカリフォスファターゼを付加したヤギ抗ウサギIgG（Bio-rad社製）を加えた（M. Iwabuchi et al. Plant Molecular Biology (1999)39:183-188)）に、PVDF膜を移しそれぞれ1時間振とうした。100mlのTTBS（20mM Tris-HCl (pH7.5), 500mM NaCl, 0.05% Tween20）にPVDF膜を移し、10分間振とうした。この操作を3回繰り返し過剰の2次抗体液を洗い流した。ATPA検出用として、パーオキシダーゼに対する化学発光システム「ECL+」（Amersham社製）を用い、5秒間露光検出した。ORF125検出用として、アルカリフォスファターゼの発色基質であるBCIP/NBT（MOSS Inc. 社製）を用い、5分間発色検出した。

その結果、2系統の細胞質雄性不稔ナタネのつぼみ、稔性回復ナタネ、細胞質雄性不稔系統に当該DNAが挿入された形質転換体ナタネのつぼみでは、コントロールであるATPAの蓄積量はほとんど変化しないが、ORF125タンパク質の蓄積量は形質転換体ナタネで優位に減少していることが示された。この減少の度合いは、細胞質雄性不稔系統に交配によって稔性回復遺伝子が導入された稔性回復系統と同等である（図4、及びM. Iwabuchi et al. Plant Molecular Biology (1999)39:183-188）。また、ORF125タンパク質蓄積量の減少の度合いを希釈系列と比較すると、稔性回復ナタネで1/8～1/16、形質転換ナタネで1/8程度であ

ることが解った。以上、先に述べたようにナタネでは稔性が回復する事とORF 125タンパク質の蓄積量が減少する事とは、強く連鎖し、同意の関係にあることから、当該DNA配列は、ミトコンドリア内のORF 125タンパク質蓄積量を減少させる働きがあり、稔性回復遺伝子を保持したゲノムDNA配列であることが証明された。

さらに開花体から葯を取り出し、顕微鏡観察したところ、正常な花粉が形成されていることが確認できた（図5）。

#### 実施例9：cDNAの単離

cDNAの単離は、RNA供与体として、遺伝子地図を作製したときに用いたF<sub>2</sub>集団よりRf1遺伝子をホモに持つ花粉稔性のあるF<sub>2</sub>個体を選び、つぼみからmRNAを精製した後、cDNAを合成後、5'-RACEまたは3'-RACE法を用いて行った。

（mRNAの精製）

Rf1遺伝子をホモに持つ花粉稔性のあるF<sub>2</sub>個体のつぼみから、常法であるグアニジウムチオシアネート法により、RNeasyキット（Qiagen社）を用いて、全RNAを抽出した。全RNAからPolyA+RNAを、Origo(dT)セルロースカラムを用いた「mRNA Purification kit」（Amersham Pharmacia社）を用いて精製しmRNAとした。

（5'-RACEと3'-RACEによるcDNAの単離）

精製したmRNA・1μgを用いて、5'-RACEと3'-RACE法による「Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE」キットを用いてcDNAを単離した。遺伝子特異的プライマーとして5'-RACEには5'-GATTCCTTTCTCTTGCATTTCAG-3'（配列番号10）を使用し、3'-RACEには、5'-ATCTCGTCCTTTACCTTCTGTGG-3'（配列番号11）を使用した。得られたクローンの塩基配列を確定後、cDNA配列を得た（配列番号2）。

#### 実施例10：cDNAのアミノ酸配列への変換と解析

（1）cDNAのアミノ酸配列への変換は、通常のジェネティックコードを用いて、

遺伝子解析ソフト「Genetyx-SV」(ソフトウェア開発(株))を用いて行い、配列番号3に記載のアミノ酸配列を得た。PPRモチーフの解析は、Protein families database of alignments and HMNs(以下Pfamと略

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>)にあるプログラムで行った。解析の結果、配列番号1に示した稔性回復遺伝子の翻訳産物は16個のPPRモチーフを持つタンパク質である事を見出した。またPPRモチーフは、3つのPPRクラスターとなっていた。その3つとは、

- ① PPRクラスター#1 : N末端から1番目のPPRモチーフから5番目のPPRモチーフが連続した175残基からなるPPRクラスター、
  - ② PPRクラスター#2 : N末端から6番目のPPRモチーフから12番目のPPRモチーフが連続した245残基からなるPPRクラスター、並びに
  - ③ PPRクラスター#3 : N末端から13番目のPPRモチーフから16番目のPPRモチーフが連続した140残基からなるPPRクラスター、
- であった。

#### 実施例11 : 本発明のタンパク質の解析

コセナ細胞質雄性不稔を引き起こす原因タンパク質ORF125の遺伝子の転写産物(mRNA)に結合することで大腸菌において翻訳阻害を起こすかどうかの実験を行った。

配列番号2に示した稔性回復遺伝子を実験ベクターpQE-80L(Qiagen社)のBamHI-SphI部位に導入し、6個のヒスチジン残基が(6XHis)N末端に付加する実験ベクターを構築した(pQEB1/cds6)。また、pSTV29(宝酒造)ベクターを鋳型として、BamHI部位を導入するプライマー:CGGGATCCGCTCACAATT(配列番号12)と、M13プライマーRV(宝酒造(株))を用いてDNAを増幅した。DNAの増幅は、Takara LA PCR Kit(宝酒造(株))を用いた。増幅したDNAを、制限酵素BamHI、EcoRI(宝酒造(株))で切断後、Suprec-02(宝酒造(株))を用いて精製した。orf125遺伝子の5'-UTR領域とorf125の25アミノ酸の両端にBamHIとEcoRI部位を

有するDNA断片を合成するために、2本のプライマーを用いて、藤本の方法（植物のPCR実験プロトコール：合成DNAの実際PP84-87（秀潤社））に従って、PCRを行った。プライマーは、

125-5' BamHI :

GCGGATCCCAATTTTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATCGACCTCGCAAGGTTTTTGAAACGGCCGAA  
ACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTC（配列番号13）

125-5' EcoRI :

GGAATTCCTAACTTTACATTTCAGTAGGAGTGAGATTATGACAAAAAGTGGACAATTTTTCGAAAAAGGTAA  
TCATGCATTTATATGCTGAAGAAAAGCG（配列番号14）

の2本を用いた。増幅したDNAを、制限酵素BamHI、EcoRI（宝酒造（株））で切断後、Suprec-02（宝酒造（株））を用いて精製した。精製したDNAはTaKaRa Ligation kit（宝酒造（株））を用いて結合させ、大腸菌DH10B（Gibco BRL社製）に形質転換した。50  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール（Sigma社製）を加えたLB寒天培地（1%Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto-Agar, 0.1mIPTG, 20 $\mu$ g/ml X-Gal）にて、18時間以上37℃で培養した。薄く青いコロニーから、定法によりプラスミドを抽出し塩基配列を確認した。この様にして、EcoRI部位からlacZ遺伝子の転写開始点の間にorf125遺伝子の5'-UTR領域とorf125の25アミノ酸を含む174bp（図6に記載の塩基配列のうち、7～180番目）を導入したベクターを構築した（pSTV125-5' #LA6）。また同時に該174bpに相当する部分に数箇所に変異を起こさせた断片（図6に記載の塩基配列の7～183番目）を持つベクターが得られた（pSTV125-5' #LA12）。

該ベクターpSTV125-5' #LA6及び#LA12をそれぞれ、大腸菌DH10B（GibcoBRL社）に導入し、LB培地に50  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール（和光純薬社）、200  $\mu$ MのIPTG（和光純薬社）、40  $\mu$ g/mlのX-Gal（宝酒造社）を加えた寒天培地で、37℃一晩静地培養し、コロニーを生育させたところ、薄く青色になった。すなわち、いずれのベクターを導入した大腸菌においても導入されたLacZ遺伝子が発現したことが認められた。

さらに、上述のpSTV125-5' ベクターとpQEB1/cds6ベクターとを共に上記と同様の大腸菌に導入するために、上記培地に50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを加えた培地を用いて培養したところ、pSTV125-5' #LA6と共存させた場合は、コロニーが白くなったが、導入断片部位に変異を有するpSTV125-5' #LA12と共存させた場合は、コロニーが薄く青くなり、青さの程度は#LA12単独の場合と変わり無かった。尚、導入したこれらのベクターが大腸菌から欠落していないかについては、それぞれのコロニーを培養後、常法によりベクターを抽出することで確認した。

以上の結果より、pQEB1/cds6ベクターにより大腸菌内で発現したタンパク質は、pSTV125-5' #LA6のmRNAと結合した結果、LacZ遺伝子の発現が抑えられ白いコロニーになったと考えられる。また、pSTV125-5' #LA12と共存させた場合には、導入断片部位に変異を有することによりpQEB1/cds6由来のタンパク質がmRNAに結合することが出来ず、その結果LacZ遺伝子が発現し青色になったと考えられる。

このことから、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質はorf125のmRNA、より具体的には、少なくともorf125-5' UTR領域とORF125の25アミノ酸残基のコード領域の転写産物に関与して、ORF125タンパク質の発現を抑えているものと推察される。

すなわち、本発明の遺伝子の翻訳産物は、ミトコンドリアに移送された後に、該ミトコンドリア内で、雄性不稔遺伝子と結合し、翻訳を阻害することで、細胞質雄性不稔の原因タンパク質の蓄積量を減少させることにより、細胞質雄性不稔性を可稔に回復していることが推察される。

#### 実施例12：コセナナタネ稔性回復遺伝子の単離

コセナダイコンの稔性回復遺伝子を細胞融合により導入して得られたナタネの系統（以下コセナナタネ）から、PCR法を用いて稔性回復遺伝子のゲノム配列を得た。コセナナタネの葉0.1gからキアゲン社のDNA単離キット（DNeasy plant mini）を用いてDNAを抽出した。DNA増幅のために、配列番号1の塩基配列1027bpから1059bpまでの配列である5'-ACATAAAATCACTAGATACTTGACATGGAGGC-3'（配列番号

30) を、フォワードプライマーとして設定し、配列番号1の塩基配列7675bpから7651bpまでの配列である5'-AAGAGGAGGAAGATGGCATCACAGC-3' (配列番号31) を、リバースプライマーとして設定した。

10  $\mu$  l のコセナナタネDNA溶液 (50ng/ $\mu$  l) に、49  $\mu$  l の滅菌水、10  $\mu$  l の10x LA PCR緩衝液 (宝酒造社製)、10  $\mu$  l の25mM MgCl<sub>2</sub>、16  $\mu$  l の2.5mM dNTP mix、2  $\mu$  l の10  $\mu$  Mフォワードプライマー溶液、2  $\mu$  l の10  $\mu$  Mリバースプライマー溶液、1  $\mu$  l の5 unit/ $\mu$  l のTaKaRa LA Taq (宝酒造社製) を加えて混和後、98°C20秒、68°C15分のサイクルを30回繰り返す事によりDNAを増幅した。サーマルサイクラーは、UNOII (Biometra社製) を使用した。反応終了後、限外ろ過フィルターMicrocon-PCR (ミリポア社製) を用いて約6 kbの増幅産物を精製した。精製された増幅産物を鋳型として、配列番号1における4280~7585番目に相当する部分について、定法により塩基配列3306bpを決定した (配列番号15)。得られたコセナナタネのゲノム塩基配列と園紅ダイコンの配列を比較したところ、3306bpのうち7bpのみDNA塩基置換がみつき、高い相同性を有することが解った。

またコセナナタネの稔性回復遺伝子の3' 部分cDNA配列を、RT-PCR法により取得し、イントロンが園紅ダイコンと同じ形でスプライスされている事を確認した。

コセナナタネのつぼみから、常法であるAGPC (Acid

Guanidium-Phenol-Chloroform) 法 (秀潤社 細胞工学別冊バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎 P161~166) により、全RNAを抽出した。1  $\mu$  g の全RNAより、SUPERScript II RNaseH<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen社製) を用いてcDNAを合成した。稔性回復遺伝子3' 部分特異的フォワードプライマーとして5'-TGGAGTAAAGAGGAACTAAAAAGGGC-3' (配列番号32) を使用し、稔性回復遺伝子3' 部分特異的リバースプライマーとして、

5'-CAGACAATAGACGCATAAAAGGC-3' (配列番号33) を使用した。1  $\mu$  l のコセナナタネcDNA溶液に、14.9  $\mu$  l の滅菌水、2.5  $\mu$  l の10x PCR緩衝液 (宝酒造社製)、1.5  $\mu$  l の25mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$  l の2.5mM dNTP mix、1.5  $\mu$  l の10  $\mu$  Mフォワードプライマー溶液、1.5  $\mu$  l の10  $\mu$  Mリバースプライマー溶液、0.1  $\mu$  l の5 unit/ $\mu$  l のTaKaRa Taq

(宝酒造社製)を加えて混和後、94℃40秒、60℃30秒、72℃2分のサイクルを35回繰り返す事によりDNAを増幅した。サーマルサイクラーは、UNOII (Biometra社製)を使用した。3μlの増幅産物に、pGEM-Teasy ベクター (プロメガ社製) 1μlと5μlの2xligation 緩衝液 (プロメガ社製) , 1μlのT4 DNA ligase (プロメガ社製)を加え、室温で1時間放置して、ベクターに結合させた。このベクターを大腸菌DH5α (Gibco BRL社製)に形質転換してクローンを得た。得られたクローンについて定法により塩基配列を確定し、コセナタネのcDNAは、園紅ダイコンと同様に、イントロンがスプライスされていることが確認できた。すなわち、先のゲノム配列の比較により見つかった7bpの塩基置換は配列番号1の5444bp-5814bpに存在し、スプライシングに影響を与えていないことが判明した。

以上のことからコセナタネの稔性回復遺伝子は、園紅ダイコンと同様な形でmRNAを発現していることが解った。翻訳領域のみをコードするcDNA配列を配列番号16に記す。さらに、このcDNA配列からアミノ酸配列を得た(配列番号17)。

実施例13：ダイコン野生種*Raphanus raphanistrum* (以下*R. raphanistrum*)稔性回復遺伝子部分配列の単離

*R. raphanistrum*の稔性回復遺伝子の部分配列をcDNAから単離した。

(mRNAの精製)

*R. raphanistrum*のつぼみから、常法であるAGPC (Acid Guanidium-Phenol-Chloroform) 法 (秀潤社 細胞工学別冊バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎 P161~166) により、全RNAを抽出した。全RNAからPolyA+RNAを、Origo(dT)セルロースカラムを用いた「mRNA Purification kit」(Amersham Pharmacia社)を用いて精製しmRNAとした。

(cDNAの部分配列単離)

精製した1μgのmRNAより、「Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE」キット(Clontech社製)を用いてcDNAを合成した。

稔性回復遺伝子特異的フォワードプライマーとして

5' -GATTCCTTTCTCTTGCATTTTCAG-3' (配列番号 34) を使用し、  
稔性回復遺伝子特異的リバープライマーとして、

5' -ATCTCGTCCTTTACCTTCTGTGG-3' (配列番号 35) を使用した。

1  $\mu$ l の *R. raphanistrum* cDNA 溶液に、14.4  $\mu$ l の滅菌水、2.5  $\mu$ l の 10x Pyrobest PCR 緩衝液 (宝酒造社製)、2  $\mu$ l の 2.5mM dNTP mix、2.5  $\mu$ l の 10  $\mu$ M フォワードプライマー溶液、2.5  $\mu$ l の 10  $\mu$ M リバープライマー溶液、0.1  $\mu$ l の 5 unit/ $\mu$ l の Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社製) を加えて混和後、98°C 5 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒のサイクルを 30 回繰り返す事により DNA を増幅した。サーマルサイクラーは、UNOII (Biometra 社製) を使用した。増幅した DNA 溶液に 0.1  $\mu$ l の 5 unit/ $\mu$ l TaKaRa Taq (宝酒造社製) を加えて混和後、72°C 10 分加温処理し、DNA の 3' 末端にアデニンヌクレオチドを付加した。3  $\mu$ l の増幅産物に、pGEM-Teasy ベクター (プロメガ社製) 1  $\mu$ l と 5  $\mu$ l の 2x ligation 緩衝液 (プロメガ社製)、1  $\mu$ l の T4 DNA ligase (プロメガ社製) を加え、室温で 1 時間放置して、ベクターに結合させた。このベクターを大腸菌 DH5  $\alpha$  (Gibco BRL 社製) に形質転換してクローンを得た。得られたクローンを定法により塩基配列を確定後、cDNA 部分配列を得た (配列番号 20)。さらに cDNA 配列から、アミノ酸配列を得た (配列番号 21)。

#### 実施例 14 : オグラナタネ稔性回復遺伝子の単離

オグラダイコンの稔性回復遺伝子を交配により導入して得られたナタネの系統 (以下オグラナタネ) から、5' -RACE 法と 3' -RACE 法を用いて稔性回復遺伝子の cDNA 配列を単離した。

(mRNA の精製)

オグラナタネのつぼみから、常法である AGPC (Acid Guanidium-Phenol-Chloroform) 法 (秀潤社 細胞工学別冊バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎 P161~166) により、全 RNA を抽出した。全 RNA から PolyA+RNA を、Origo(dT) セルロースカラムを用いた「mRNA Purification kit」 (Amersham Pharmacia 社) を用いて精製し mRNA とした。



## (c DNAの部分配列単離)

精製した1  $\mu$ g のmRNAより、「Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE」キット(Clontech社製)を用いてc DNA を合成した。稔性回復遺伝子特異的フォワードプライマーとして5' -GATCCATGCATTTGTCAAGG-3' (配列番号36)を使用し、稔性回復遺伝子特異的リバースプライマーとして、5' -CATTTGTGTAGCCTCATCTAGG-3' (配列番号37)を使用した。

1  $\mu$ lのオグラナタネcDNA溶液に、14.4  $\mu$ lの滅菌水、2.5  $\mu$ lの10x Pyrobest PCR 緩衝液(宝酒造社製)、2  $\mu$ lの2.5mM dNTP mix、2.5  $\mu$ lの10  $\mu$ Mフォワードプライマー溶液、2.5  $\mu$ lの10  $\mu$ Mリバースプライマー溶液、0.1  $\mu$ lの5 unit/ $\mu$ l のPyrobest DNA polymerase (宝酒造社製)を加えて混和後、98°C5秒、55°C30秒、72°C1分30秒のサイクルを30回繰り返す事によりDNAを増幅した。サーマルサイクラーは、UNOII (Biometra社製)を使用した。増幅したDNA溶液に0.1  $\mu$ lの5 unit/ $\mu$ lのTaKaRa Taqを加えて混和後、72°C10分加温処理し、DNAの3'末端にアデニンヌクレオチドを付加した。3  $\mu$ lの増幅産物に、pGEM-Teasy ベクター(プロメガ社製)1  $\mu$ lと5  $\mu$ lの2xligation 緩衝液(プロメガ社製)、1  $\mu$ lのT4 DNA ligase (プロメガ社製)を加え、室温で1時間放置して、ベクターに結合させた。このベクターを大腸菌DH5 $\alpha$  (Gibco BRL社製)に形質転換してクローンを得た。得られたクローンを定法により塩基配列を確定後、4種類のcDNA部分配列を得た。得られた4種類の配列情報を基にして、4つに共通な部分に5' -RACEと3' -RACE用のプライマーを設定し、それぞれcDNA単離を行った。

## (5' -RACEと3' -RACEによる c DNA の単離)

上記と同様にcDNA を合成し、「Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE」キット(Clontech社製)を用いて5' -RACEと3' -RACE法を行いc DNA を単離した。遺伝子特異的プライマーとして5' -RACEには

5' -CATTTGTGTAGCCTCATCTAGG-3' (配列番号37)と

5' -GTCCGGAGAGCAGCCCTTGGTAG-3' (配列番号38)を使用し、3' -RACEには、

5' -TCATCGTATAATTCTTCAGCCTC-3' (配列番号39)を使用した。

5' RACEでは、2回PCRを行いDNAを得た。2  $\mu$  lの250倍希釈したオグラナタネcDNA溶液に、8.6  $\mu$  lの滅菌水、2  $\mu$  lの10x LA PCR緩衝液(宝酒造社製)、2  $\mu$  lの25mM MgCl<sub>2</sub>、3.2  $\mu$  lの2.5mM dNTP mix、1  $\mu$  lの10  $\mu$  M配列番号9907Fのプライマー溶液、1  $\mu$  lの10  $\mu$  Mアダプタープライマー溶液(Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE キット、Clontech社製)、0.2  $\mu$  lの5 unit/ $\mu$  lのTaKaRa LA Taq(宝酒造社製)を加えて混和後、98°C5秒、72°C3分のサイクルを5回、98°C5秒、70°C3分3のサイクルを5回、98°C5秒、68°C3分のサイクルを25回繰り返す事によりDNAを増幅した。得られたDNA溶液を100倍希釈し、そのうちの2  $\mu$  lに、8.6  $\mu$  lの滅菌水、2  $\mu$  lの10x LA PCR緩衝液(宝酒造社製)、2  $\mu$  lの25mM MgCl<sub>2</sub>、3.2  $\mu$  lの2.5mM dNTP mix、1  $\mu$  lの10  $\mu$  M配列番号5' ogu-1のプライマー溶液、1  $\mu$  lの10  $\mu$  Mアダプタープライマー溶液(Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE キット、Clontech社製)、0.2  $\mu$  lの5 unit/ $\mu$  lのTaKaRa LA Taq(宝酒造社製)を加えて混和後、98°C5秒、72°C3分のサイクルを5回、98°C5秒、70°C3分3のサイクルを5回、98°C5秒、68°C3分のサイクルを25回繰り返す事によりDNAを増幅した。サーマルサイクラーは、UNOII (Biometra社製)を使用した。

3' RACEでは、2  $\mu$  lの50倍希釈したオグラナタネcDNA溶液に、8.6  $\mu$  lの滅菌水、2  $\mu$  lの10x LA PCR緩衝液(宝酒造社製)、2  $\mu$  lの25mM MgCl<sub>2</sub>、3.2  $\mu$  lの2.5mM dNTP mix、1  $\mu$  lの10  $\mu$  M配列番号3' ogu-1のプライマー溶液、1  $\mu$  lの10  $\mu$  Mアダプタープライマー溶液(Marathon RACE system 5' RACE 3' RACE キット、Clontech社製)、0.2  $\mu$  lの5 unit/ $\mu$  lのTaKaRa LA Taq(宝酒造社製)を加えて混和後、98°C5秒、63°C30秒、72°C2分のサイクルを35回繰り返す事によりDNAを増幅した。

3  $\mu$  lの増幅産物に、pGEM-Teasy ベクター(プロメガ社製) 1  $\mu$  lと5  $\mu$  lの2xligation 緩衝液(プロメガ社製)、1  $\mu$  lのT4 DNA ligase(プロメガ社製)を加え、室温で1時間放置して、ベクターに結合させた。このベクターを大腸菌DH5  $\alpha$ (Gibco BRL社製)に形質転換してクローンを得た。得られたクローンの塩基配列を確定後、上記4種類のcDNA部分配列に対応する5' -RACE配列と3' -RACE配列を得て、各々の配列を結合して全長cDNA配列を得た。この内園紅ダイコンのcDNA配

列と最も相同性の高い配列をコセナナタネの稔性回復遺伝子とした（配列番号18）。さらにcDNA配列から、アミノ酸配列を得た（配列番号19）。

#### 実施例15：稔性回復遺伝子の解析

上記の方法で得られた各々の稔性回復遺伝子について、cDNA配列及びアミノ酸配列の相同性については遺伝子解析ソフト「Mac Vector6.5」(Oxford MolecularLtd.)を用い、モチーフ解析については、英国のサンガー研究所内にあるProtein families database of alignments and HMMsを用いて、解析を行った。

本発明の園紅ダイコン、コセナナタネ及びオグラナタネ由来のRf遺伝子は、いずれもPPRモチーフを16個有し、このPPRモチーフ群はアミノ末端側から5個、7個及び4個の3つのブロックに分割されている上、アミノ末端側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギンであった。また、ラファナス・ラファニストラム由来の部分断片についても、上述の配列に対し相当する部分（配列番号26の94～264番目）に当てはめて解析したところ、アミノ末端の1番目から6番目のPPRモチーフに相当する部分を有しており、PPRモチーフ群とアミノ末端側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸についても上記の特徴を有していた。

さらに園紅ダイコン、コセナナタネ、オグラナタネから得られた3種の稔性回復遺伝子と*R. raphanistrum*稔性回復遺伝子部分配列についての解析の結果得られた本発明のタンパク質（配列番号26）及びそれをコードする遺伝子（配列番号22）の中でも、園紅ダイコンとコセナナタネは相同性が非常に高く、アミノ酸配列では99.6%（3箇所のアミノ酸で違いが見られただけであった）、塩基配列では99.7%と高い値を示すことから、特に好ましくは配列番号29に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質、及びそれをコードする遺伝子（配列番号25）が挙げられる。

その一方で、オグラナタネと園紅ダイコン、そしてオグラナタネとコセナナタネを比較するといずれも高い相同性が認められたが、それぞれの相同性がアミノ

酸配列ではオグラナタネと園紅ダイコンを比較すると92.0%、オグラナタネとコセナタネでは91.6%であり、塩基配列ではいずれも95%程度と、園紅ダイコンとコセナタネ間の値よりは低い値を示した。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、R f 遺伝子、特に、ダイコン由来のR f 1 遺伝子が単離され、その構造が同定された。さらに、本発明によれば、単離したR f 遺伝子を利用してナタネ回復系統を確立する手段を提供することが可能になった。

## 請求の範囲

1. Pentatricopeptide Repeat (以下PPRと略) モチーフを14個以上持ち、該PPRモチーフ群は3つ以上のブロックに分割されており、該各ブロックはそれぞれ少なくとも2つ以上のPPRモチーフを有し、かつ、カルボキシ末端(C末端)側のブロックは4つのPPRモチーフを有することを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。
2. PPRモチーフの数が14～16個であることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。
3. PPRモチーフ群が3つのブロックに分割されており、アミノ末端(N末端)側から順に各ブロックが5個、7個及び4個のPPRモチーフを有することを特徴とする請求項1又は2に記載のタンパク質。
4. アミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がセリン、スレオニン又はシステイン以外であることを特徴とする請求項1～3に記載のタンパク質。
5. アミノ末端(N末端)側から2番目のPPRモチーフに存在する4番目のアミノ酸がアスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸又はヒスチジンのいずれかであることを特徴とする請求項4のタンパク質。
6. さらに、アミノ末端にミトコンドリアに移行するためのシグナルペプチド配列を有するか又はカルボキシ末端に-LysAspGluLeu-からなる配列を有することを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載のタンパク質。
7. 細胞質雄性不稔遺伝子の転写産物と接触させた後に該転写産物にゲルシフトを起こさせることを特徴とする細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。
8. 配列番号26に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。
9. 配列番号27に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔

性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

10. 配列番号28に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

11. 配列番号29に記載のアミノ酸配列を有する細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

12. 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、配列番号17に記載のアミノ酸配列の80～687番目のアミノ酸配列、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列の82～690番目のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

13. 下記の何れかのタンパク質。

(1) 配列番号3、配列番号17、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；又は

(2) 配列番号3、配列番号17、又は配列番号19に記載のアミノ酸配列において1から複数個のアミノ酸が欠失、付加及び／または置換されているアミノ酸配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するタンパク質。

14. 細胞質雄性不稔個体が、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものであることを特徴とする請求項1～9に記載のタンパク質。

15. 請求項1～10のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

16. 配列番号22に記載の塩基配列を有するDNA。
17. 配列番号23に記載の塩基配列を有するDNA。
18. 配列番号24に記載の塩基配列を有するDNA。
19. 配列番号25に記載の塩基配列を有するDNA。
20. 下記の何れかのDNA。

(1) 配列番号2、配列番号16、又は配列番号18に記載の塩基配列を有するDNA；又は

(2) 配列番号2、配列番号16、又は配列番号18に記載の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は

(3) 配列番号2、配列番号16、又は配列番号18に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

21. 下記の何れかのDNA。

(1) 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～8553番目の塩基配列又は配列番号15に記載の塩基配列の812番目～3002番目の塩基配列を有するDNA；又は

(2) 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～8553番目の塩基配列又は配列番号15に記載の塩基配列の812番目～3002番目の塩基配列において1から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA；又は

(3) 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～8553番目の塩基配列又は配列番号15に記載の塩基配列の812番目～3002番目の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与するDNA。

22. 下記の何れかのDNA。

(1) 配列番号1又は配列番号15に記載の塩基配列を有するDNA；又は

(2) 配列番号 1 又は配列番号 1 5 に記載の塩基配列において 1 から複数個の塩基が欠失、付加及び／または置換されている塩基配列を有し、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA ; 又は

(3) 配列番号 1 又は配列番号 1 5 に記載の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復することに関与する DNA。

23. 細胞質雄性不稔個体が、コセナダイコン及び／又はオグラダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子又はそのホモログを有するものである、請求項 1 5 ～ 2 2 の何れか 1 項に記載の DNA。

24. 請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA を含有するベクター。

25. 請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA 又は請求項 2 4 に記載のベクターを有する形質転換体。

26. 形質転換植物である、請求項 2 5 に記載の形質転換体。

27. 請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA を用いることを特徴とする、細胞質雄性不稔個体の不稔性を可稔に回復する方法。

28. 細胞質雄性不稔遺伝子を有し、かつ、請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA を有する細胞に、さらに請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA の一部又は全部を誘導型プロモーターと共に導入することにより、雄性不稔回復遺伝子の発現を制御することが可能となった形質転換体。

29. 請求項 2 8 に記載の形質転換体を利用することによる細胞質雄性不稔系統の維持方法。

30. 請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA から任意に設定した 1 5 ～ 5 0 mer のオリゴヌクレオチドプライマー、又は、請求項 1 5 ～ 2 3 の何れかに記載の DNA の全部又は 1 部からなる少なくとも 1 5 mer 以上のプローブを使用し、目的の生物試料中に、該プライマーにより増幅される塩基配列の量、又は、プローブにより検出される塩基配列の量が、1 ゲノム中に 1 遺伝子以上あることを確認することで、細胞質雄性不稔回復に関与する遺伝子を検出する方法。



31. 配列番号1に記載の塩基配列の3754番目～5091番目の塩基配列、又は配列番号15に記載の塩基配列の1番目～811番目の塩基配列を有する、プロモーターDNA。

図 1

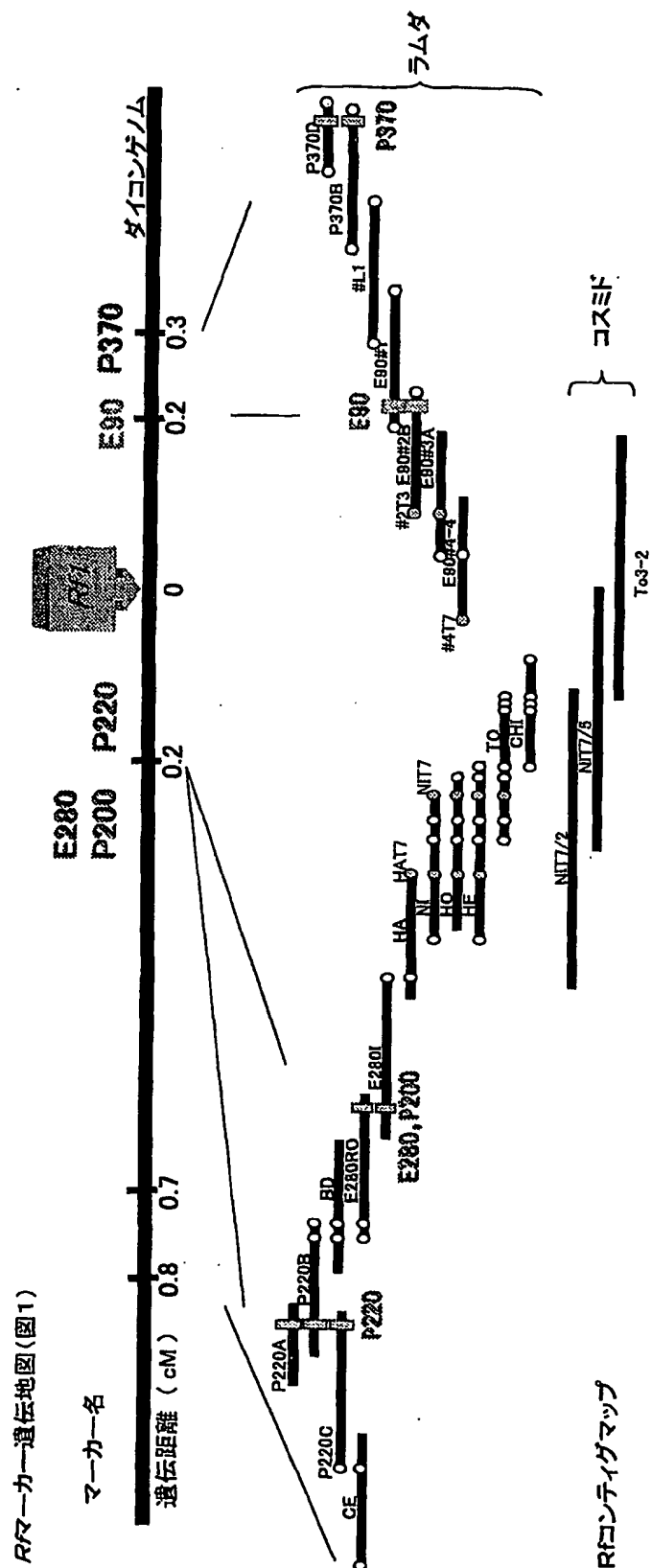


図 2

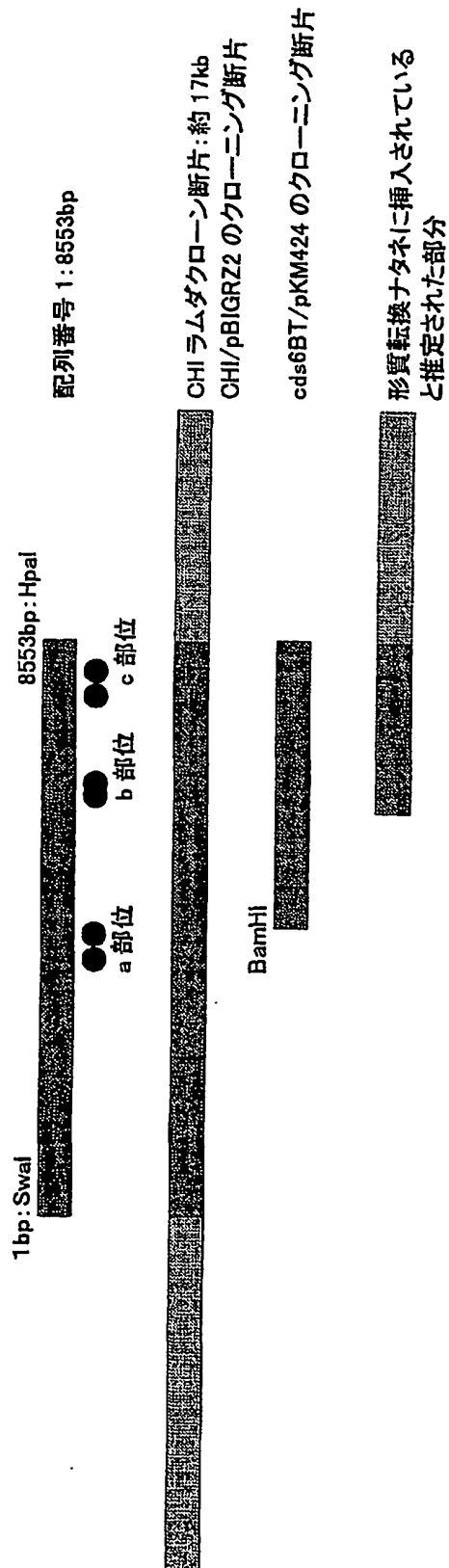


図 3

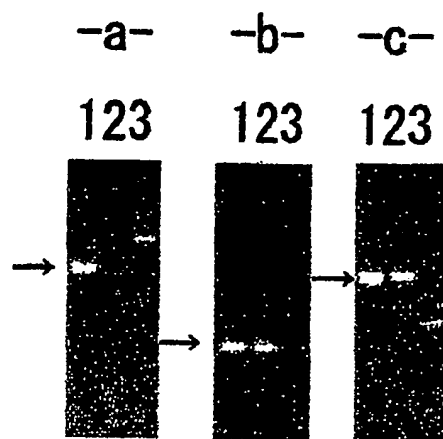


図 4

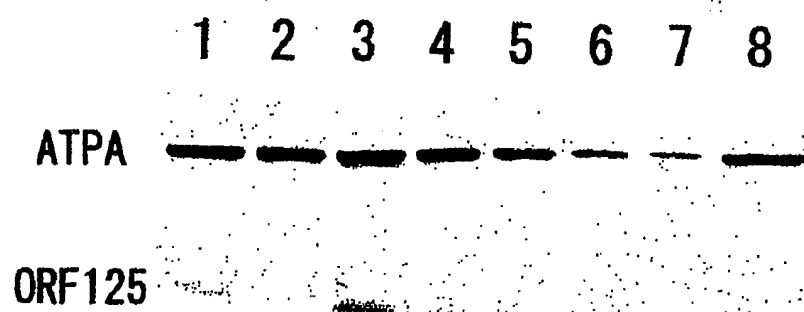
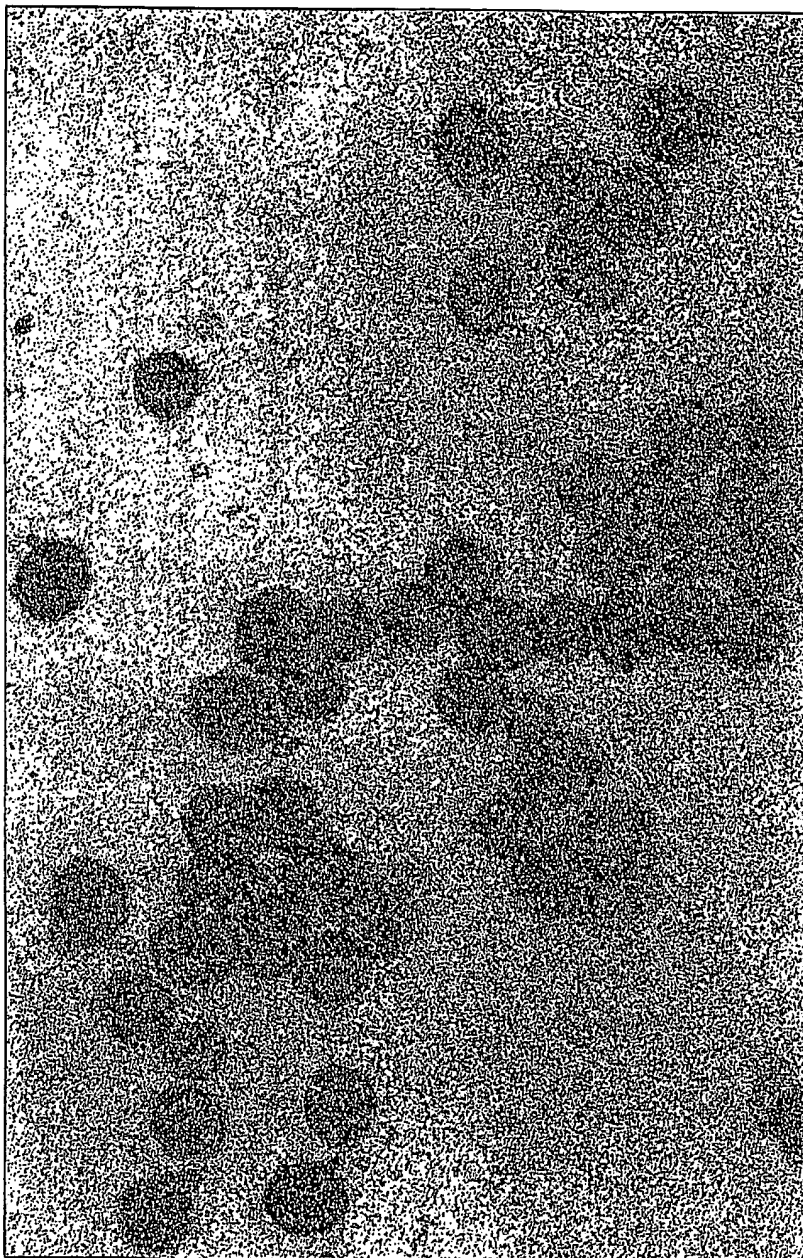


図 5





## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Mitsubishi Chemical Corporation

&lt;120&gt; A protein which is involved in recovery of cytoplasm male fertility from sterility and a gene encoding the protein

&lt;130&gt; A21220A

&lt;160&gt; 39

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8553

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Raphanus sativus

&lt;400&gt; 1

```

atttaaattt tataacttaat atgtatttaa actctccaat gcaataaggg atataaacia 60
aaggatttca tagatgttat gtattcgtac accgatgtat tcgtatacct taaatatatg 120
tataacttatg tatacatata cttgtgtatt cgtacacctt aagtattcga tgggttatgt 180
tggtattcgt atattttatg tatttgtaca ctttatgtat acttatgtat atgtacacct 240
tatgtatttg tacatcttaa gtattagatg agttatgttg atattcgtac accttatgta 300
ttcgtacacc ttctgtatac cttaggattt cgtacacctt aggtatttgt acacctaagg 360
tattcgtaca ctttatgtat acttatgtat acgtacacct tatatattcg aacaccttag 420
atattcgtac atcttatgta tacgtatact tatttcttga gttatagtga attagattgt 480
attaaacgtt agacataggg ttccggattt atccaagggt tccagattgt ttcagattct 540
ggatttacct aatggttctg gatttacctt agggttccgg atttaggatt caaggtttag 600
agtttaggat ttaggttta gtgttttgtt gatgattttt aatatttaag ataaatgtag 660
acaaatttgt tcttcctacc attttgacaa aaaatgaaag atctatgtag gtttccaagt 720
ttattaaatt taccagatt tatgaaaatt atccataaat ttatataatt ttatgaataa 780
tttatcattt atttgggtta atttcataaa tatgaaagtt tcttttatgg gtcaaaatgt 840
ataatttatt cggattctgg atttacctaa gggttccgga ttacctcaag gattccagat 900
ttaggattca tggtttagag ttaggagtt tatgtttagt gttttgttga tgattttaaa 960

```

tatttaagat aagaagttta tgcgagagaa tttggtcaaa ctcaggttga gtcttaactt 1020  
cttaagacat aaaaatcact agatacttga catggaggca ccaaattatc ctatatTTTT 1080  
tggacttaat cttggtgtac ccctagagta aaccttaagg ttcaccaacc aatagaaatc 1140  
actcatttca cagttgatat cttttaaaaa agtaaacaaa atattgtcga gttatattac 1200  
atttttaaaa taaaaatatt aaaaaataaa aataataata tatgcaaaaa aaaagatttt 1260  
ttaaaaagat ttttaatttcg tcaacaaaac actaaactct aaactctaaa tcctaaaccc 1320  
ttggataaat actaaaccct aaatttaaaaa cattaaacca taatagtatt ttttagattt 1380  
aatgttttag tgtttagtgt ttttgattta gaatttagga ttatccaagt gtttatgatt 1440  
tatccaaggg tttagggttt agaatttagg gtttaggggt tagagtttaa aattatccaa 1500  
gggtctaggg tatacccaag ggtttagggt ttaggattta gggttaggg tttagaattt 1560  
agggttagg gtttagagtt taaaattatc caagggttta gggtataccc aagggttag 1620  
ggtttaggat ttagggttta aggttagtg tttttgacg atattaaaa tagttttcaa 1680  
aaattcattt tttgtaacgg ctattatTTT tttttatat tttatttatt ttaaaaacat 1740  
aatataactt gacaatatTT tcttttcttt ttaaaaaaa tattaattat gaaatacttg 1800  
attcctattg gttgggtgaa cctaaatgtt cactctaggg gtgaacctaa ggataactct 1860  
attttttggg gtgaaatagc actatagcgg atatcttttt caatagatta taagcacggc 1920  
tctacctatg actaatcaag aacttgggat gattggaaat ctgcaggttg tactcaatat 1980  
gggattatat tggttctaac aagtagatat gatccttgaa aattaaagtt attagatcag 2040  
ttcatcgtga aagggtgtagg gttgttcatt ttattaacaa atttgtcatt tcattaacaa 2100  
tttttgtcat tttataaaca tgaaaattat aacgaatgca ctttgtgcc agatcccaat 2160  
ttgtcatttt atttttggga aaaaaatgta gcatttcgtg agtgtttcta ttttggcaa 2220  
aaacaaaaag tgtgagatca attttgacca aaaaaaatg taagattcac gtaggtttcc 2280  
aaatttatta aatttaccba actatattaa aattaaatgt agacaaattt gtttcctgc 2340  
cattttggca aaaaatgaag gatctatgaa ggtttccaag tttattaaat ttactcagat 2400  
ttatgataat tatccataaa ttacataat tttatgaatt atcatttatt tgggtagatt 2460  
tcataaatat gaaagtttct tttatgagtc aaaatgtata atttattggg taactttcat 2520  
aaattttaga atttcatcg attttatatt aattcgtata gatttatgtt gactttatat 2580



atgaaaaaat atgtattata ttaaaagtag ttgctcatat atgattttta aatattaaat 2640  
atgatccaaa agtttaaatga ataaagaatg tttatggaat ttacaaaagt tagttggttaa 2700  
aagttagtgg gaaaaaaatt attttttata ggcaaagtgg attttgggtc ccacgaaatt 2760  
acttttccaa cttgccaaagt ttaataggca aaaagggttaa aaatgtcata aattttattct 2820  
ctctctacta ggttgcccaa ttgcctaata taaacttgag gtggcctatt tttctaattc 2880  
aaacttaaaa gttgcccttt ccctaattg acccataaaa gaatgaaaga catttttctt 2940  
ttccaaatta caatccctag ataattttat tttgtagggtg cattccatcg gttatgatta 3000  
cagaatagct acgcttctct attgattctt attgcgccgt tgggtgacgtt ttccatggaa 3060  
tcaagtagtg ttttatctcc tatcactaac aacatattca tagattttgt ttatcacttg 3120  
ttctgtgttc ctgatcatat acttgactca gtttctgtga tttcatcaag tttttgagaa 3180  
cagaagaagc aaaaaagaaa acgagcagag ctgctcttac aatgttttaa ccgtgagtga 3240  
taaattttatt tacataaaag tatttttaaaa atagatttaa tcaaccaatt taatatatta 3300  
ttttatatatt agttcatttt tttttgacat cttttatatt tagtttagaa cacctctatt 3360  
tgagtacaac atagattata atgataaatt tataaaatag cataattttt tattttcatt 3420  
gttttatgat aaaattctaa ataacaataa ttataatatt attatattac taattgcaaa 3480  
aattaattaa tacattattt tataataaat atttaaaacg ttgggtagga ttttgtaga 3540  
tttttttcaa caaattttgt tatagctaaa ataaaattca aatgtattgt taaaattgat 3600  
tttttttttt ttgattatt aagatttaat ataaataaac atatatgtca tattaaatat 3660  
ttaactaagt ggtcctaate ttggaactag gggtaggcgt tcgggtacct attcgggttt 3720  
cggttcgagt ctattcgat ttccgatttt tggggtcaaa gattttagcc ccattcggtt 3780  
atttctaaat tacggttcgg gttcggttcg gatccttgcg gattcgggtc gggttcggat 3840  
aaccggttta aattattttc aaaattttta aatttcatta tatattttta acttttcgaa 3900  
atttgtaaac aaaataatat attacatata aatttcaata atatgtgtcg aagtaccaa 3960  
acttaacatg taaattgggt tgatttggt atttggtatg aaaatcaatc atattttata 4020  
tatttttggt gttttgagta tgctttaact atttatacat gtacttttta atgtttttat 4080  
atattttcta gtattttgaa caatttaaaa gtattatata tatttttagat gctttttaat 4140  
atatattcaa tctaaaaata gttaaataa tatgtatatt aatctatttc ggatacattc 4200

ggatatccaa aatattttgg ttcggatcgg gttcggtttt ggttctttta ataccacaaa 4260  
tttaaaccta ttcggatatt caattaattt cggttcggat ttggtattac ttttgcagat 4320  
cggattcggg tcggttcttt ggattcagtt tttttgtcca gccctactct gaacagtaga 4380  
taaaaaatag aaccctaaat taatagggtta gattttgggt aggtctttct aattagtatg 4440  
gagattctcg attccttctc attgcagtgt ggtatgtcca actcattgtt tatgtacata 4500  
tccaatttag ttttgagtca aatgtttagt tacttaagag ttgaatgaaa taggggatga 4560  
tattgatggc caaggttctc ccaaagtaaa taactttgtt tatatittaa gttagcttat 4620  
aacatcaata aaaatgtcat taactgggtc aataaaaatg tcattaactg gttcctctaa 4680  
tataattatt taacacacct ggctgttgat aaatttttat gatcgtttta taattttaga 4740  
agtggatagt ctgtaaatgg tctttgattg gtcgtcttga tttttaaag tggactaaac 4800  
aagaaggctt agtaataaat actgaaccgg aactctactg gtttcaatag ctcggtttat 4860  
caatttctct cggctctggg tttagtgaat catgtggccc tgtgggttta aacaaggaac 4920  
tcaatcaatc aactggtgac aaatctgaac cggaaattgt ataattcaaa ctgaaccggt 4980  
tcttgtaaaa caaatggaac cgtttgtac tttatctctc gtttattttc tcagtcacga 5040  
gtttttttta gagatcgacg aagaacaaaa tttaggcgaa acaaaaataa aatgttggct 5100  
agggtttgtg gattcaagtg ttcttcttct cctgctgagt ctgcggctag attgttctgt 5160  
acgagatcga ttcgtgatac tctggccaag gcaagcggag agagttagca agcaggtttt 5220  
ggaggagaga gtttgaagct gcaaagtggg tttcatgaaa tcaaagggtt agaggatgag 5280  
attgatttgt tcagtgacat gcttcgatct cgtcctttac cttctgtggt tgatttctgt 5340  
aaattgatgg gtgtgggtgt gagaatggaa cgcccgatc ttgtgatttc tctctatcag 5400  
aagatggaaa ggaaacagat tcgatgtgat atatacagct tcaatattct gataaaatgt 5460  
ttctgcagct gctctaagct cccctttgct ttgtctacat ttgtaagat caccaagctt 5520  
ggactccacc ctgatgttgt taccttcacc accctgctcc atggattatg tgtggaagat 5580  
agggtttctg aagccttgga tttttttcat caaatgttg aaacgacatg taggccaat 5640  
gtcgtaacct tcaccacttt gatgaacggt ctttgccgag agggtagaat tgtcgaagcc 5700  
gtagctctgc ttgatcggat gatggaagat ggtctccagc ctaccagat tacttatgga 5760  
acaatcgtag atgggatgtg taagaaggga gatactgtgt ctgcactgaa tctgtgagg 5820

aagatggagg aggtgagcca catcataccc aatgttghtaa tctatagtgc aatcattgat 5880  
agccttttga aagacggacg tcatagcgat gcacaaaatc ttttactga aatgcaagag 5940  
aaaggaatct tccccgattt atttacctac aacagtatga tagttgggtt ttgtagctct 6000  
ggtagatgga gcgacgcgga gcagttgttg caagaaatgt tagaaaggaa gatcagccct 6060  
gatgttghtaa cttataatgc tttgatcaat gcatttgtca aggaaggcaa gttctttgag 6120  
gctgaagaat tatacgatga gatgcttcca aggggtataa tccctaatac aatcacatat 6180  
agttcaatga tcgatggatt ttgcaaacag aatcgtcttg atgctgctga gcacatgttt 6240  
tatttgatgg ctaccaaggg ctgctctccc aacctaatac ctttcaatac tctcatagac 6300  
ggatattgtg gggctaagag gatagatgat ggaatggaac ttctccatga gatgactgaa 6360  
acaggattag ttgctgacac aactacttac aacactctta ttcacgggtt ctatctggtg 6420  
ggcgatctta atgctgctct agacctttta caagagatga tctctagtgg tttgtgccct 6480  
gatatcggtta cttgtgacac tttgctggat ggtctctgcg ataatgggaa actaaaagat 6540  
gcattggaaa tgtttaaggt tatgcagaag agtaagaagg atcttgatgc tagtcacccc 6600  
ttcaatgggtg tggaacctga tgttcaaact tacaatatat tgatcagcgg cttgatcaat 6660  
gaagggaagt ttttagaggc cgaggaatta tacgaggaga tgccccacag gggatatagtc 6720  
ccagatacta tcacctatag ctcaatgac gatggattat gcaagcagag ccgcctagat 6780  
gaggctacac aaatgtttga ttcgatgggt agcaagagct tctctccaaa cgtagtgacc 6840  
tttactacac tcattaatgg ctactgtaag gcaggaaggg ttgatgatgg gctggagctt 6900  
ttctgcgaga tgggtcgaag agggatagtt gctaacgcaa ttacttacat cactttgatt 6960  
tgtggttttc gtaaagtggg taatattaat ggggctctag acattttcca ggagatgatt 7020  
tcaagtgggtg tgtatcctga taccattacc atccgcaata tgctgactgg tttatggagt 7080  
aaagaggaac taaaaagggc agtggcaatg cttgagaaac tgcagatgag tatggtatgt 7140  
aagtttctgt tcagtctatg tattttttat ataaacaaga atgtatacat tcttttgtgt 7200  
gtagcttcag attgatgata cacgttctgg aattaacat tggtttggtt ttgcattgta 7260  
ggatctatca tttgggggat gaatgatcaa agattttctt ctgtttgcgc agcagagctt 7320  
caatgtcatt ttgtttctgc tgctgcatgt ataccctact aatgtttgat caaatcggtg 7380  
aatagagtga tcatagtga aaattgtgtg gttagtaagt tattttgctg ctattctaata 7440

gacagccttt tatgcgtcta ttgtctgggc ttaataaatt tgaccatttc caattaaatt 7500  
 ccatacactt gtttcacgca agattattgg tctgaactaa agaggcacac cttccagaag 7560  
 atttcaggtg ttaaaagatg tttaggtgtc tgcccgttct gtagctgtca ccatggttat 7620  
 cgtcaagctc ggtcttcatg agagctgata gctgtgatgc catcttcctc ctcttcttca 7680  
 tattggctct gtccctgcctt gtctgctccc atgtgggttc aggaggagat catgttcttt 7740  
 taatcttggg ggaaatgttg ttgtcgctta tgcttctctg gttcgctctt tgacttgctt 7800  
 agcttcattc tttatctcca aattgctatg aaatcaattt accataagta gaataaactt 7860  
 gcagattcat tctattattg ctttaagcttt tgttaatcaa caaagaaacc agagacgaga 7920  
 aatacaaact ctataagctt ctcttttttc tttcttgata gtaaaaccgg ttagagagta 7980  
 gagattgatc atatgaacta aaaatcgata ctaaaacggt ttggctccga cttataaacc 8040  
 ggaacccac cgttttgcat ctctctctca aacatcacac aatgtccaag atgaagaagt 8100  
 atttgtgttg tcatctctct gggtgaggag atgcaaagt tatattctaa ttgttttcag 8160  
 tgcttggctt aactttttta agagattact ccagtggtt ggatcaaaga aagagtcaac 8220  
 attgcattgt gtaaggtgac gaaaactgag ttaaagtaag tgagaacaat acttcaatgc 8280  
 tttcttgtg acaacctgtg taatcatcgc atttgaatat atatgtatat gatgcttatg 8340  
 atgaagctat gagaataggc aaatagggtc tgtgttattt ccctgcgatt ctagattctg 8400  
 atttgttttt cttctttaat atttagatta ggtggtcttg cttatcctgt tttagtatta 8460  
 gagtgggagt tttggggatg aatcatcccg gatgatatat acaattgtgt attttatgaa 8520  
 tttcagtttt tagtggataa tgaacacggt aac 8553

<210> 2

<211> 2064

<212> DNA

<213> *Raphanus sativus*

<400> 2

atg ttg gct agg gtt tgt gga ttc aag tgt tct tct tct cct gct gag 48

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu

1

5

10

15

tct gcg gct aga ttg ttc tgt acg aga tcg att cgt gat act ctg gcc 96  
 Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala  
 20 25 30  
 aag gca agc gga gag agt tgc gaa gca ggt ttt gga gga gag agt ttg 144  
 Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu  
 35 40 45  
 aag ctg caa agt ggg ttt cat gaa atc aaa ggt tta gag gat gcg att 192  
 Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile  
 50 55 60  
 gat ttg ttc agt gac atg ctt cga tct cgt cct tta cct tct gtg gtt 240  
 Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val  
 65 70 75 80  
 gat ttc tgt aaa ttg atg ggt gtg gtg gtg aga atg gaa cgc ccg gat 288  
 Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp  
 85 90 95  
 ctt gtg att tct ctc tat cag aag atg gaa agg aaa cag att cga tgt 336  
 Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys  
 100 105 110  
 gat ata tac agc ttc aat att ctg ata aaa tgt ttc tgc agc tgc tct 384  
 Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser  
 115 120 125  
 aag ctc ccc ttt gct ttg tct aca ttt ggt aag atc acc aag ctt gga 432  
 Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Ile Thr Lys Leu Gly  
 130 135 140  
 ctc cac cct gat gtt gtt acc ttc acc acc ctg ctc cat gga tta tgt 480  
 Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys  
 145 150 155 160

gtg gaa gat agg gtt tct gaa gcc ttg gat ttt ttt cat caa atg ttt 528  
 Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Phe Phe His Gln Met Phe  
 165 170 175  
 gaa acg aca tgt agg ccc aat gtc gta acc ttc acc act ttg atg aac 576  
 Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn  
 180 185 190  
 ggt ctt tgc cgc gag ggt aga att gtc gaa gcc gta gct ctg ctt gat 624  
 Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp  
 195 200 205  
 cgg atg atg gaa gat ggt ctc cag cct acc cag att act tat gga aca 672  
 Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr  
 210 215 220  
 atc gta gat ggg atg tgt aag aag gga gat act gtg tct gca ctg aat 720  
 Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 ctg ctg agg aag atg gag gag gtg agc cac atc ata ccc aat gtt gta 768  
 Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val  
 245 250 255  
 atc tat agt gca atc att gat agc ctt tgt aaa gac gga cgt cat agc 816  
 Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser  
 260 265 270  
 gat gca caa aat ctt ttc act gaa atg caa gag aaa gga atc ttt ccc 864  
 Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro  
 275 280 285  
 gat tta ttt acc tac aac agt atg ata gtt ggt ttt tgt agc tct ggt 912  
 Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly  
 290 295 300

aga tgg agc gac gcg gag cag ttg ttg caa gaa atg tta gaa agg aag 960  
 Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys  
 305 310 315 320  
 atc agc cct gat gtt gta act tat aat gct ttg atc aat gca ttt gtc 1008  
 Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val  
 325 330 335  
 aag gaa ggc aag ttc ttt gag gct gaa gaa tta tac gat gag atg ctt 1056  
 Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu  
 340 345 350  
 cca agg ggt ata atc cct aat aca atc aca tat agt tca atg atc gat 1104  
 Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp  
 355 360 365  
 gga ttt tgc aaa cag aat cgt ctt gat gct gct gag cac atg ttt tat 1152  
 Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr  
 370 375 380  
 ttg atg gct acc aag ggc tgc tct ccc aac cta atc act ttc aat act 1200  
 Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr  
 385 390 395 400  
 ctc ata gac gga tat tgt ggg gct aag agg ata gat gat gga atg gaa 1248  
 Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu  
 405 410 415  
 ctt ctc cat gag atg act gaa aca gga tta gtt gct gac aca act act 1296  
 Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr  
 420 425 430  
 tac aac act ctt att cac ggg ttc tat ctg gtg ggc gat ctt aat gct 1344  
 Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala  
 435 440 445

gct cta gac ctt tta caa gag atg atc tct agt ggt ttg tgc cct gat 1392  
 Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp  
 450 455 460  
 atc gtt act tgt gac act ttg ctg gat ggt ctc tgc gat aat ggg aaa 1440  
 Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys  
 465 470 475 480  
 cta aaa gat gca ttg gaa atg ttt aag gtt atg cag aag agt aag aag 1488  
 Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys  
 485 490 495  
 gat ctt gat gct agt cac ccc ttc aat ggt gtg gaa cct gat gtt caa 1536  
 Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln  
 500 505 510  
 act tac aat ata ttg atc agc ggc ttg atc aat gaa ggg aag ttt tta 1584  
 Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu  
 515 520 525  
 gag gcc gag gaa tta tac gag gag atg ccc cac agg ggt ata gtc cca 1632  
 Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro  
 530 535 540  
 gat act atc acc tat agc tca atg atc gat gga tta tgc aag cag agc 1680  
 Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser  
 545 550 555 560  
 cgc cta gat gag gct aca caa atg ttt gat tcg atg ggt agc aag agc 1728  
 Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser  
 565 570 575  
 ttc tct cca aac gta gtg acc ttt act aca ctc att aat ggc tac tgt 1776  
 Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys  
 580 585 590



aag gca gga agg gtt gat gat ggg ctg gag ctt ttc tgc gag atg ggt 1824  
Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly

595

600

605

cga aga ggg ata gtt gct aac gca att act tac atc act ttg att tgt 1872  
Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys

610

615

620

ggt ttt cgt aaa gtg ggt aat att aat ggg gct cta gac att ttc cag 1920  
Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln

625

630

635

640

gag atg att tca agt ggt gtg tat cct gat acc att acc atc cgc aat 1968  
Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn

645

650

655

atg ctg act ggt tta tgg agt aaa gag gaa cta aaa agg gca gtg gca 2016  
Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala

660

665

670

atg ctt gag aaa ctg cag atg agt atg gat cta tca ttt ggg gga tga 2064  
Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly

675

680

685

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 687

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Raphanus sativus

&lt;400&gt; 3

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu

1

5

10

15

Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20

25

30

Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu  
 35 40 45  
 Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile  
 50 55 60  
 Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp  
 85 90 95  
 Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys  
 100 105 110  
 Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser  
 115 120 125  
 Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Ile Thr Lys Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys  
 145 150 155 160  
 Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Phe Phe His Gln Met Phe  
 165 170 175  
 Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn  
 180 185 190  
 Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp  
 195 200 205  
 Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr  
 210 215 220  
 Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val

	245	250	255
Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser			
	260	265	270
Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro			
	275	280	285
Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly			
	290	295	300
Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys			
305	310	315	320
Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val			
	325	330	335
Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu			
	340	345	350
Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp			
	355	360	365
Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr			
	370	375	380
Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr			
385	390	395	400
Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu			
	405	410	415
Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr			
	420	425	430
Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala			
	435	440	445
Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp			
	450	455	460

Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys  
 465                      470                      475                      480  
 Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys  
                     485                      490                      495  
 Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln  
                     500                      505                      510  
 Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu  
                     515                      520                      525  
 Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro  
                     530                      535                      540  
 Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser  
 545                      550                      555                      560  
 Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser  
                     565                      570                      575  
 Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys  
                     580                      585                      590  
 Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly  
                     595                      600                      605  
 Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys  
                     610                      615                      620  
 Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln  
 625                      630                      635                      640  
 Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn  
                     645                      650                      655  
 Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala  
                     660                      665                      670  
 Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly

675

680

685

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

gaagcaaaaa agaaaacgag cagag 25

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

ccaaaaatcc gaaatccgaa tagac 25

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

ctcggctctg ggtttagtga 20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

tccacaaacc ctagccaaca

20

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

gcttatgctt ctctggttcg cctc

24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

ctcagttttc gtcaccttac acaatgc

27

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

gattcctttc tcttgcatTT cag 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

atctcgtcct ttaccttctg tgg 23

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

cgggatccgc tcacaatt 18

<210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gcggatccca atttcattct gcatactct cccgtgctgtt atcgacctcg caaggTTTTT 60

gaaacggccg aaacgggaag tgacaatacc gcttttcttc 100

<210> 14

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

ggaattcact aactttacat tcagtaggag tgagattatg acaaaaagtg gacaattttt 60

cgaaaaaggt aatcatgcat ttatatgctg aagaaaagcg 100

<210> 15

<211> 3306

<212> DNA

<213> Raphanus sativus

<400> 15

caattaattt cggttcggat ttggtattac ttttgcagat cggattcggg tcggttcttt 60

ggattcagtt tttttgtcca gccctactct gaacagtaga taaaaaatag aaccctaaat 120

taataggtta gattttgggt aggtctttct aattagtatg gagattctcg attccttctc 180

attgcagtgt ggtatgtcca actcattggt tatgtacata tccaatttag ttttgagtca 240

aatgtttagt tacttaagag ttgaatgaaa taggggatga tattgatggc caaggttctc 300

ccaaagtaaa taactttggt tatattttta gttagcttat aacatcaata aaaatgtcat 360

taactggttc aataaaaatg tcattaactg gttcctctaa tataattatt taacacacct 420

ggctgttgat aaatttttat gatcgtttta taattttaga agtggatagt ctgtaaatgg 480

tctttgattg gtctgttga tttttaaaag tggactaaac aagaaggctt agtaataaat 540

actgaaccgg aactctactg gtttcaatag ctcggtttat caatttctct cggctctggg 600

tttagtgaat catgtggccc tgtgggttta aacaaggaa tcaatcaatc aactggtgac 660

aatctgaac cggaaattgt ataattcaaa ctgaaccggg tcttgtaaaa caaatggaac 720



ccgtttgtac tttatctctc gtttattttc tcagtcacga gtttttttta gagatcgacg 780  
aagaacaaaa tttaggcgaa acaaaaaataa aatgtttgct agggttttgtg gattcaagtg 840  
ttcttcttct cctgctgagt ctgcggctag attgttctgt acgagatcga ttcgtgatac 900  
tctggccaag gcaagcggag agagttgcga agcaggtttt ggaggagaga gtttgaagct 960  
gcaaagtggg tttcatgaaa tcaaaggttt agaggatgcg attgatttgt tcagtgacat 1020  
gcttcgatct cgtcctttac cttctgtggt tgatttctgt aaattgatgg gtgtggtggt 1080  
gagaatggaa cgcccggatc ttgtgatttc tctctatcag aagatggaaa ggaaacagat 1140  
tcgatgtgat atatacagct tcaatattct gataaaatgt ttctgcagct gctctaagct 1200  
cccctttgct ttgtctacat ttggttaagct caccaagctt ggactccacc ctgatgttgt 1260  
taccttcacc accctgctcc acggattgtg cgtggaagat agggtttctg aagctttgaa 1320  
tttgtttcat caaatgtttg aaacgacatg taggccaat gtcgtaacct tcaccacttt 1380  
gatgaacggg ctttgccgag agggtagaat tgtcgaagcc gtagctctgc ttgatcggat 1440  
gatggaagat ggtctccagc ctaccagat tacttatgga acaatcgtag atgggatgtg 1500  
taagaaggga gatactgtgt ctgcactgaa tctgctgagg aagatggagg aggtgagcca 1560  
catcataccc aatgtttgta tctatagtgc aatcattgat agcctttgta aagacggacg 1620  
tcatagcgat gcacaaaatc ttttcaactga aatgcaagag aaaggaatct ttcccgattt 1680  
atttacctac aacagtatga tagttggttt ttgtagctct ggtagatgga gcgacgcgga 1740  
gcagttgttg caagaaatgt tagaaaggaa gatcagccct gatgttgtaa cttataatgc 1800  
tttgatcaat gcatttgtca aggaaggcaa gttctttgag gctgaagaat tatacgatga 1860  
gatgcttcca aggggtataa tccctaatac aatcacatat agttcaatga tcgatggatt 1920  
ttgcaaacag aatcgtcttg atgctgctga gcacatgttt tatttgatgg ctaccaaggg 1980  
ctgctctccc aacctaatac ctttcaatac tctcatagac ggatattgtg gggctaagag 2040  
gatagatgat ggaatggaac ttctccatga gatgactgaa acaggattag ttgctgacac 2100  
aactacttac aacactctta ttcacgggtt ctatctggtg ggcatctta atgctgctct 2160  
agacctttta caagagatga tctctagtgg tttgtgccct gatatcgta cttgtgacac 2220  
tttgctggat ggtctctgag ataattggaa actaaaagat gcattggaaa tgtttaaggt 2280  
tatgcagaag agtaagaagg atcttgatgc tagtcacccc ttcaatggtg tggaacctga 2340

tgttcaaact tacaatatat tgatcagcgg cttgatcaat gaagggaagt ttttagaggc 2400  
 cgaggaatta tacgaggaga tgccccacag gggatatagtc ccagatacta tcacctatag 2460  
 ctcaatgata gatggattat gcaagcagag ccgcctagat gaggctacac aaatgtttga 2520  
 ttcgatgggt agcaagagct tctctccaaa cgtagtgacc ttactacac tcattaatgg 2580  
 ctactgtaag gcaggaaggg ttgatgatgg gctggagctt ttctgcgaga tgggtcgaag 2640  
 agggatagtt gctaacgcaa ttacttacat cactttgatt tgtggttttc gtaaagtggg 2700  
 taatattaat ggggctctag acattttcca ggagatgatt tcaagtgggtg tgtatcctga 2760  
 taccattacc atccgcaata tgctgactgg tttatggagt aaagaggaaac taaaagggc 2820  
 agtggcaatg cttgagaaac tgcagatgag tatggtatgt aagtttctgt tcagtctatg 2880  
 tattttttat ataaacaaga atgtatacat tcttttgtgt gtagcttcag attgatgata 2940  
 cacgttctgg aattaacat tggtttggtt ttgcattgta ggatctatca tttgggggat 3000  
 gaatgatcaa agattttctt ctgtttgcgc agcagagctt caatgtcatt ttgtttctgc 3060  
 tgctgcatgt atacctact aatgtttgat caaatcgttg aatagagtga tcatagtga 3120  
 aaattgtgtg gttagtaagt tattttgctg ctattctaata gacagccttt tatgctcta 3180  
 ttgtctgggc ttaataaatt tgaccatttc caattaaatt ccatacactt gtttcacgca 3240  
 agattattgg tctgaactaa agaggcacac cttccagaag atttcaggtg taaaagatg 3300  
 tttagg 3306

<210> 16

<211> 2064

<212> DNA

<213> *Raphanus sativus*

<400> 16

atg ttg gct agg gtt tgt gga ttc aag tgt tct tct tct cct gct gag 48  
 Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu  
 1 5 10 15  
 tct gcg gct aga ttg ttc tgt acg aga tcg att cgt gat act ctg gcc 96  
 Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20	25	30	
aag gca agc gga gag agt tgc gaa gca ggt ttt gga gga gag agt ttg	144		
Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu			
35	40	45	
aag ctg caa agt ggg ttt cat gaa atc aaa ggt tta gag gat gcg att	192		
Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile			
50	55	60	
gat ttg ttc agt gac atg ctt cga tct cgt cct tta cct tct gtg gtt	240		
Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val			
65	70	75	80
gat ttc tgt aaa ttg atg ggt gtg gtg gtg aga atg gaa cgc ccg gat	288		
Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp			
85	90	95	
ctt gtg att tct ctc tat cag aag atg gaa agg aaa cag att cga tgt	336		
Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys			
100	105	110	
gat ata tac agc ttc aat att ctg ata aaa tgt ttc tgc agc tgc tct	384		
Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser			
115	120	125	
aag ctc ccc ttt gct ttg tct aca ttt ggt aag ctc acc aag ctt gga	432		
Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Leu Thr Lys Leu Gly			
130	135	140	
ctc cac cct gat gtt gtt acc ttc acc acc ctg ctc cac gga ttg tgc	480		
Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys			
145	150	155	160
gtg gaa gat agg gtt tct gaa gct ttg aat ttg ttt cat caa atg ttt	528		
Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asn Leu Phe His Gln Met Phe			

165	170	175	
gaa acg aca tgt agg ccc aat gtc gta acc ttc acc act ttg atg aac			576
Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn			
180	185	190	
ggt ctt tgc cgc gag ggt aga att gtc gaa gcc gta gct ctg ctt gat			624
Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp			
195	200	205	
cgg atg atg gaa gat ggt ctc cag cct acc cag att act tat gga aca			672
Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr			
210	215	220	
atc gta gat ggg atg tgt aag aag gga gat act gtg tct gca ctg aat			720
Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn			
225	230	235	240
ctg ctg agg aag atg gag gag gtg agc cac atc ata ccc aat gtt gta			768
Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val			
245	250	255	
atc tat agt gca atc att gat agc ctt tgt aaa gac gga cgt cat agc			816
Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser			
260	265	270	
gat gca caa aat ctt ttc act gaa atg caa gag aaa gga atc ttt ccc			864
Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro			
275	280	285	
gat tta ttt acc tac aac agt atg ata gtt ggt ttt tgt agc tct ggt			912
Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly			
290	295	300	
aga tgg agc gac gcg gag cag ttg ttg caa gaa atg tta gaa agg aag			960
Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys			

305                      310                      315                      320  
 atc agc cct gat gtt gta act tat aat gct ttg atc aat gca ttt gtc 1008  
 Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val  
                     325                      330                      335  
 aag gaa ggc aag ttc ttt gag gct gaa gaa tta tac gat gag atg ctt 1056  
 Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu  
                     340                      345                      350  
 cca agg ggt ata atc cct aat aca atc aca tat agt tca atg atc gat 1104  
 Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp  
                     355                      360                      365  
 gga ttt tgc aaa cag aat cgt ctt gat gct gct gag cac atg ttt tat 1152  
 Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr  
                     370                      375                      380  
 ttg atg gct acc aag ggc tgc tct ccc aac cta atc act ttc aat act 1200  
 Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr  
 385                      390                      395                      400  
 ctc ata gac gga tat tgt ggg gct aag agg ata gat gat gga atg gaa 1248  
 Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu  
                     405                      410                      415  
 ctt ctc cat gag atg act gaa aca gga tta gtt gct gac aca act act 1296  
 Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr  
                     420                      425                      430  
 tac aac act ctt att cac ggg ttc tat ctg gtg ggc gat ctt aat gct 1344  
 Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala  
                     435                      440                      445  
 gct cta gac ctt tta caa gag atg atc tct agt ggt ttg tgc cct gat 1392  
 Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp

450                      455                      460  
 atc gtt act tgt gac act ttg ctg gat ggt ctc tgc gat aat ggg aaa 1440  
 Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys  
 465                      470                      475                      480  
 cta aaa gat gca ttg gaa atg ttt aag gtt atg cag aag agt aag aag 1488  
 Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys  
                     485                      490                      495  
 gat ctt gat gct agt cac ccc ttc aat ggt gtg gaa cct gat gtt caa 1536  
 Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln  
                     500                      505                      510  
 act tac aat ata ttg atc agc ggc ttg atc aat gaa ggg aag ttt tta 1584  
 Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu  
                     515                      520                      525  
 gag gcc gag gaa tta tac gag gag atg ccc cac agg ggt ata gtc cca 1632  
 Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro  
                     530                      535                      540  
 gat act atc acc tat agc tca atg atc gat gga tta tgc aag cag agc 1680  
 Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser  
 545                      550                      555                      560  
 cgc cta gat gag gct aca caa atg ttt gat tcg atg ggt agc aag agc 1728  
 Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser  
                     565                      570                      575  
 ttc tct cca aac gta gtg acc ttt act aca ctc att aat ggc tac tgt 1776  
 Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys  
                     580                      585                      590  
 aag gca gga agg gtt gat gat ggg ctg gag ctt ttc tgc gag atg ggt 1824  
 Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly

595                      600                      605  
 cga aga ggg ata gtt gct aac gca att act tac atc act ttg att tgt 1872  
 Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys  
 610                      615                      620  
 ggt ttt cgt aaa gtg ggt aat att aat ggg gct cta gac att ttc cag 1920  
 Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln  
 625                      630                      635                      640  
 gag atg att tca agt ggt gtg tat cct gat acc att acc atc cgc aat 1968  
 Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn  
 645                      650                      655  
 atg ctg act ggt tta tgg agt aaa gag gaa cta aaa agg gca gtg gca 2016  
 Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala  
 660                      665                      670  
 atg ctt gag aaa ctg cag atg agt atg gat cta tca ttt ggg gga tga 2064  
 Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly Xaa  
 675                      680                      685  
 <210> 17  
 <211> 688  
 <212> PRT  
 <213> Raphanus sativus  
 <400> 17  
 Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala  
 20                      25                      30  
 Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu  
 35                      40                      45

Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile  
 50 55 60  
 Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp  
 85 90 95  
 Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys  
 100 105 110  
 Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser  
 115 120 125  
 Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Leu Thr Lys Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys  
 145 150 155 160  
 Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Asn Leu Phe His Gln Met Phe  
 165 170 175  
 Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn  
 180 185 190  
 Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp  
 195 200 205  
 Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr  
 210 215 220  
 Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val  
 245 250 255  
 Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser



	260		265		270										
Asp	Ala	Gln	Asn	Leu	Phe	Thr	Glu	Met	Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Phe	Pro
	275		280		285										
Asp	Leu	Phe	Thr	Tyr	Asn	Ser	Met	Ile	Val	Gly	Phe	Cys	Ser	Ser	Gly
	290		295		300										
Arg	Trp	Ser	Asp	Ala	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Glu	Met	Leu	Glu	Arg	Lys
	305		310		315										
Ile	Ser	Pro	Asp	Val	Val	Thr	Tyr	Asn	Ala	Leu	Ile	Asn	Ala	Phe	Val
		325			330					335					
Lys	Glu	Gly	Lys	Phe	Phe	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr	Asp	Glu	Met	Leu
	340		345		350										
Pro	Arg	Gly	Ile	Ile	Pro	Asn	Thr	Ile	Thr	Tyr	Ser	Ser	Met	Ile	Asp
	355		360		365										
Gly	Phe	Cys	Lys	Gln	Asn	Arg	Leu	Asp	Ala	Ala	Glu	His	Met	Phe	Tyr
	370		375		380										
Leu	Met	Ala	Thr	Lys	Gly	Cys	Ser	Pro	Asn	Leu	Ile	Thr	Phe	Asn	Thr
	385		390		395										
Leu	Ile	Asp	Gly	Tyr	Cys	Gly	Ala	Lys	Arg	Ile	Asp	Asp	Gly	Met	Glu
		405			410									415	
Leu	Leu	His	Glu	Met	Thr	Glu	Thr	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Thr	Thr	Thr
		420			425									430	
Tyr	Asn	Thr	Leu	Ile	His	Gly	Phe	Tyr	Leu	Val	Gly	Asp	Leu	Asn	Ala
	435		440		445										
Ala	Leu	Asp	Leu	Leu	Gln	Glu	Met	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Cys	Pro	Asp
	450		455		460										
Ile	Val	Thr	Cys	Asp	Thr	Leu	Leu	Asp	Gly	Leu	Cys	Asp	Asn	Gly	Lys
	465		470		475									480	

Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys

485

490

495

Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln

500

505

510

Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu

515

520

525

Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro

530

535

540

Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser

545

550

555

560

Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser

565

570

575

Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys

580

585

590

Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly

595

600

605

Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys

610

615

620

Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln

625

630

635

640

Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn

645

650

655

Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala

660

665

670

Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly Xaa

675

680

685

<210> 18

&lt;211&gt; 2073

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Raphanus sativus

&lt;400&gt; 18

atg ttg gct agg gtt tgt gga ttc aag tgt tct tct tct cct gct gtg 48

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Val

1

5

10

15

tct gcg gct aga ttg ttc tgt acg aga tcg att cgt gat act ctg gcc 96

Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20

25

30

aag gca agc agg gat gga gag agt tgc gaa gca ggt ttt gga gga gag 144

Lys Ala Ser Arg Asp Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu

35

40

45

agt ttg aag ctg caa agt ggg ttt cat gaa atc aaa ggt tta gag gat 192

Ser Leu Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp

50

55

60

gcg att gat ttg ttc agt gac atg ctt cga tct cgt cct tta cct tct 240

Ala Ile Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser

65

70

75

80

gtg gtt gat ttc tgt aaa ttg atg ggt gtg gtg gtg agg atg aaa cgc 288

Val Val Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Lys Arg

85

90

95

ccg gat gtt gtg att tct ctc cat aag aag atg gaa atg cgg cgc att 336

Pro Asp Val Val Ile Ser Leu His Lys Lys Met Glu Met Arg Arg Ile

100

105

110

cca tgt gat gca tac agc ttc aat att ctg ata aag tgt ttc tgc agc 384

Pro Cys Asp Ala Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser

115	120	125	
tgc tct aag ctg ccc ttt gct ttg tct aca ttt ggt aag ctc acc aag	432		
Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Leu Thr Lys			
130	135	140	
ctt gga ctc cac cct gat gtt gtt acc ttc acc acc ctt ctc cac gga	480		
Leu Gly Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly			
145	150	155	160
ttg tgt gtg gaa aat agg ggt tct gaa gct ttg aat ttg ttt cat caa	528		
Leu Cys Val Glu Asn Arg Gly Ser Glu Ala Leu Asn Leu Phe His Gln			
165	170	175	
atg ttt gaa acg rca tgt agg ccc aat gtc gta acc ttc acc act ttg	576		
Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu			
180	185	190	
atg aac ggt ctt tgc cgc gag ggt aga att gtc gaa gcc gta gct cta	624		
Met Asn Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu			
195	200	205	
ctt gat cgg atg atg gaa gat ggt ctc cag cct acc cag att act tat	672		
Leu Asp Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr			
210	215	220	
gga aca atc gta gat ggg atg tgt aag aag gga gat act gtg tct gca	720		
Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala			
225	230	235	240
ctg aat ctg ctg agg aag atg gag gag gtg agc cac atc ata ccc aat	768		
Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn			
245	250	255	
gtt gta atc tat agt gca atc att gat agc ctt tgt aaa gac gga cgt	816		
Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg			

260 265 270  
 cat agc gat tct caa aat ctt ttc act gaa atg caa gag aaa gga atc 864  
 His Ser Asp Ser Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile  
 275 280 285  
 ttt cca gat tta ttt acc tac aac tgt atg atc aac ggg ttt tgt agc 912  
 Phe Pro Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Cys Met Ile Asn Gly Phe Cys Ser  
 290 295 300  
 tct ggt aga tgg atc gac gcg gag cag ttg ttg caa gaa atg tta gaa 960  
 Ser Gly Arg Trp Ile Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu  
 305 310 315 320  
 agg aag atc agc cct gat gtt gta act tat aat gct ttg atc aat gca 1008  
 Arg Lys Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala  
 325 330 335  
 ttt gtc aag gaa ggc aag ttc ttt gag gct gaa gaa tta tac gat gag 1056  
 Phe Val Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu  
 340 345 350  
 atg ctt cct agg ggt ata atc cct aat aca atc aca tat agt tca atg 1104  
 Met Leu Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met  
 355 360 365  
 atc gat gga ttt tgc aaa cag aat cgt ctt gat gct gct gag cac atg 1152  
 Ile Asp Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met  
 370 375 380  
 ttt tat ttg atg cct acc aag ggc tgc tct ccg gac gta ttc act ttc 1200  
 Phe Tyr Leu Met Pro Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asp Val Phe Thr Phe  
 385 390 395 400  
 aat act ctc ata gac gga tat cgt ggg gct aag agg ata gat gat gga 1248  
 Asn Thr Leu Ile Asp Gly Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly

405 410 415  
 atg gaa ctt ctc cat gag atg act gaa gca gga tta gtt gct aac aca 1296  
 Met Glu Leu Leu His Glu Met Thr Glu Ala Gly Leu Val Ala Asn Thr  
 420 425 430  
 gtt act tac aac act ctt att cac ggg ttt tgt cag gtg ggc gat ctt 1344  
 Val Thr Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Cys Gln Val Gly Asp Leu  
 435 440 445  
 act gct gct cta gac ctt cta cat gag atg att tct agt ggt gtg tgc 1392  
 Thr Ala Ala Leu Asp Leu Leu His Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Cys  
 450 455 460  
 cct aat gtc gtt act tgt agc act ttg ctg gat ggt ctc tgc gat aac 1440  
 Pro Asn Val Val Thr Cys Ser Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn  
 465 470 475 480  
 ggg aaa cta aaa gat gca tgg gaa ctg ttt aag gtt atg cag aag agt 1488  
 Gly Lys Leu Lys Asp Ala Trp Glu Leu Phe Lys Val Met Gln Lys Ser  
 485 490 495  
 aag atg gat ctt gat gct agt cac ccc ttc aat ggt gtg gaa cct gat 1536  
 Lys Met Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp  
 500 505 510  
 gtt caa act tac aat ata ttg atc agc ggc ttg atc aat gaa ggg aag 1584  
 Val Gln Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys  
 515 520 525  
 ttt tta gag gct gag gaa tta tac aag gag atg ccc cac agg ggt ata 1632  
 Phe Leu Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Lys Glu Met Pro His Arg Gly Ile  
 530 535 540  
 gtc cca gat act att acc tat agc tca atg atc gat gga cta tgc aag 1680  
 Val Pro Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys

33/79

690

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 691

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Raphanus sativus

&lt;400&gt; 19

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Val

1 5 10 15

Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20 25 30

Lys Ala Ser Arg Asp Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu

35 40 45

Ser Leu Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp

50 55 60

Ala Ile Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser

65 70 75 80

Val Val Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Lys Arg

85 90 95

Pro Asp Val Val Ile Ser Leu His Lys Lys Met Glu Met Arg Arg Ile

100 105 110

Pro Cys Asp Ala Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser

115 120 125

Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Leu Thr Lys

130 135 140

Leu Gly Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly

145 150 155 160

Leu Cys Val Glu Asn Arg Gly Ser Glu Ala Leu Asn Leu Phe His Gln



	165	170	175
Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu			
	180	185	190
Met Asn Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu			
	195	200	205
Leu Asp Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr			
	210	215	220
Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala			
225	230	235	240
Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn			
	245	250	255
Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg			
	260	265	270
His Ser Asp Ser Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile			
	275	280	285
Phe Pro Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Cys Met Ile Asn Gly Phe Cys Ser			
	290	295	300
Ser Gly Arg Trp Ile Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu			
305	310	315	320
Arg Lys Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala			
	325	330	335
Phe Val Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu			
	340	345	350
Met Leu Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met			
	355	360	365
Ile Asp Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met			
	370	375	380

Phe Tyr Leu Met Pro Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asp Val Phe Thr Phe  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Asn Thr Leu Ile Asp Gly Tyr Arg Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly  
    405                                      410                                      415  
 Met Glu Leu Leu His Glu Met Thr Glu Ala Gly Leu Val Ala Asn Thr  
    420                                      425                                      430  
 Val Thr Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Cys Gln Val Gly Asp Leu  
    435                                      440                                      445  
 Thr Ala Ala Leu Asp Leu Leu His Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Cys  
    450                                      455                                      460  
 Pro Asn Val Val Thr Cys Ser Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn  
 465                                      470                                      475                                      480  
 Gly Lys Leu Lys Asp Ala Trp Glu Leu Phe Lys Val Met Gln Lys Ser  
    485                                      490                                      495  
 Lys Met Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp  
    500                                      505                                      510  
 Val Gln Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys  
    515                                      520                                      525  
 Phe Leu Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Lys Glu Met Pro His Arg Gly Ile  
    530                                      535                                      540  
 Val Pro Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys  
 545                                      550                                      555                                      560  
 Gln Ser Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser  
    565                                      570                                      575  
 Lys Ser Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asp Gly  
    580                                      585                                      590  
 Tyr Cys Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu

595                      600                      605  
 Met Gly Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Thr Ile Thr Tyr Ile Thr Leu  
 610                      615                      620  
 Ile Arg Gly Phe Arg Asn Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile  
 625                      630                      635                      640  
 Phe Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Gly Ile Ile Thr Ile  
 645                      650                      655  
 Arg Ser Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Thr  
 660                      665                      670  
 Val Ala Met Leu Glu Glu Leu Gln Met Ser Val Gly Tyr Gln Leu Glu  
 675                      680                      685  
 Asp Glu Xaa

690

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 516

&lt;212&gt; DNA

<213> *Raphanus raphanistrum*

&lt;400&gt; 20

a atg gaa cgc ccg gat ctt gtg att tct ctc tat caa aag atg gaa agg 49

Met Glu Arg Pro Asp Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg

1

5

10

15

aaa cag att cca tgt gat gta tac agc ttt aat att ctg ata aaa tgt 97

Lys Gln Ile Pro Cys Asp Val Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys

20

25

30

ttc tgc agt tgc tct aag ctt ccc ttt gct ttg tct aca ttt ggt aag 145

Phe Cys Ser Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys

35

40

45

atc acc aag ctt gga ctc cac cct gat gtt gct acc ttc aac acc ctg 193  
 Ile Thr Lys Leu Gly Leu His Pro Asp Val Ala Thr Phe Asn Thr Leu  
           50                    55                    60  
 ctc cac gga tta tgt ctt gat aag agg gtt tct gaa gcc ttg gat ttg 241  
 Leu His Gly Leu Cys Leu Asp Lys Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Leu  
       65                    70                    75                    80  
 ttt cat caa atg ttt gaa acg aca tgt agg ccg aac atc ata acg ttt 289  
 Phe His Gln Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Ile Ile Thr Phe  
                     85                    90                    95  
 acc acg ctg atg aac ggt ctt tgc tac gag ggt aga gtt gtc gaa gct 337  
 Thr Thr Leu Met Asn Gly Leu Cys Tyr Glu Gly Arg Val Val Glu Ala  
                     100                    105                    110  
 gta gct ctg ctt gat cgg atg cta gaa gat ggt ctc cag cct gac cag 385  
 Val Ala Leu Leu Asp Arg Met Leu Glu Asp Gly Leu Gln Pro Asp Gln  
                     115                    120                    125  
 att act tac gga aca att gta gac ggg atg tgt aag atg gga gac act 433  
 Ile Thr Tyr Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Met Gly Asp Thr  
                     130                    135                    140  
 gtg tct gca ttg aat ctt ctg agg aag atg gag gag ttg agc cac atc 481  
 Val Ser Ala Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Leu Ser His Ile  
       145                    150                    155                    160  
 aaa ccc aat gtg gta atc tat agt gcc atc att ga 516  
 Lys Pro Asn Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile  
                     165                    170

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 171

&lt;212&gt; DNA

<213> *Raphanus raphanistrum*

<400> 21

```

Met Glu Arg Pro Asp Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg
  1             5             10             15
Lys Gln Ile Pro Cys Asp Val Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys
          20             25             30
Phe Cys Ser Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys
          35             40             45
Ile Thr Lys Leu Gly Leu His Pro Asp Val Ala Thr Phe Asn Thr Leu
          50             55             60
Leu His Gly Leu Cys Leu Asp Lys Arg Val Ser Glu Ala Leu Asp Leu
          65             70             75             80
Phe His Gln Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Ile Ile Thr Phe
          85             90             95
Thr Thr Leu Met Asn Gly Leu Cys Tyr Glu Gly Arg Val Val Glu Ala
          100            105            110
Val Ala Leu Leu Asp Arg Met Leu Glu Asp Gly Leu Gln Pro Asp Gln
          115            120            125
Ile Thr Tyr Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Met Gly Asp Thr
          130            135            140
Val Ser Ala Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Leu Ser His Ile
          145            150            155            160
Lys Pro Asn Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile
          165            170

```

<210> 22

<211> 2073

<212> DNA

&lt;213&gt; Raphanus

&lt;400&gt; 22

atgttggtta gggtttgttg attcaagtgt tcttcttctc ctgctgwgct tgcggctaga 60  
 ttgttctgta cgagatcgat tctgtatact ctggccaagg caagcrgga krnnnnnngt 120  
 tgcgaagcag gttttggagg agagagtttg aagctgcaaa gtgggtttca tgaaatcaaa 180  
 ggtttagagg atgcgattga tttgttcagt gacatgcttc gatctcgtcc tttaccttct 240  
 gtggttgatt tctgtaaatt gatgggtgtg gtggtgagra tgraacgccc ggatsttgtg 300  
 atttctctcy atmaraagat ggaaakgmrr crsattcsat gtgatriyata cagcttyaat 360  
 attctgataa artgtttctg cagytgctct aagctbccct ttgctttgtc tacatttggg 420  
 aagmtcacca agcttggact ccacctgat gttgytacct tcamcaccct kctccaygga 480  
 ttrtgystkg awrakagggk ttctgaagcy ttgratttkt ttcatacaat gtttgaaacg 540  
 rcatgtaggc csaayrtcrt aacsttyacc ackytgatga acggtctttg cyrcgagggt 600  
 agarttgtcg aagcygtagc tctrettgat cggatgmtrg aagatgggtct ccagcctrmc 660  
 cagattactt ayggaacaat ygtagayggg atgtgtaaga wgggagayac tgtgtctgca 720  
 ytgaatctkc tgaggaagat ggaggagktg agccacatca waccaatgt kgtaatctat 780  
 agtgcmatca ttgatagcct ttgtaaagac ggacgtcata gcgatkwcga aaatcttttc 840  
 actgaaatgc aagagaaagg aatctttccm gatttattta cctacaacwg tatgatmrwy 900  
 ggkttttgta gctctggtag atggakcgac gcggagcagt tgttgcaaga aatgtagaa 960  
 aggaagatca gccctgatgt tgtaacttat aatgctttga tcaatgcatt tgtcaaggaa 1020  
 ggcaagttct ttgaggctga agaattatac gatgagatgc ttccwagggg tataatccct 1080  
 aatacaatca catatagttc aatgatcgat ggattttgca aacagaatcg tcttgatgct 1140  
 gctgagcaca tgttttatct gatgsctacc aagggtctgt ctccsracst awtcactttc 1200  
 aatactctca tagacggata tygtggggct aagaggatag atgatggaat ggaacttctc 1260  
 catgagatga ctgaarcagg attagtgtct racacaryta cttacaacac tcttattcac 1320  
 gggttytrtc wgggtgggca tcttamtgct gctctagacc ttytacawga gatgatytct 1380  
 agtggtktgt gccctratrt cgttacttgt rrcactttgc tggatgggtct ctgcgataay 1440  
 gggaaactaa aagatgcatk ggaamtgttt aaggttatgc agaagagtaa gawggatctt 1500

gatgctagtc accccttcaa tgggtgtggaa cctgatgttc aaacttacia tatattgatc 1560  
 agcggcttga tcaatgaagg gaagttttta gaggcygagg aattatacra ggagatgccc 1620  
 cacaggggta tagtcccaga tactatyacc tatagctcaa tgatcgatgg aytatgcaag 1680  
 cagagccgcc trgatgaggc tacacaaatg tttgattcga tgggtagcaa gagcttctct 1740  
 ccaaacgtag tgacctttac tacactcatt ratggctact gtaargcagg aagggttgat 1800  
 gatgggctgg agcttttctg cgagatgggt mgaagaggga tagttgctaa yrcaattact 1860  
 tacatcactt tgattygtgg ttttcgyaaw gtgggtaata ttaatggggc tctagacatt 1920  
 ttccaggaga tgatttcaag tgggtgtgtat cctgrtayca ttacyatccg cartatgctg 1980  
 actggtttat ggagtaaaga ggaactaaaa aggrcagtggt caatgcttga graactgcag 2040  
 atgagtrtgg rkywwymrtt kgrggrwkra tga 2073

<210> 23

<211> 2073

<212> DNA

<213> Raphanus

<400> 23

atgttggcta gggtttgtgg attcaagtgt tcttcttctc ctgctgwgtc tgcggctaga 60  
 ttgttctgta cgagatcgat tcgtgatact ctggccaagg caagcrgga krrnnnnngt 120  
 tgcgaagcag gttttggagg agagagtttg aagctgcaaa gtgggtttca tgaaatcaaa 180  
 ggtttagagg atgcgattga tttgttcagt gacatgcttc gatctcgtcc tttaccttct 240  
 gtggttgatt tctgtaaatt gatgggtgtg gtggtgagra tgraacgccc ggatsttgtg 300  
 atttctctcy atmagaagat ggaaakgmrr crsattcsat gtgatrtyata cagcttcaat 360  
 attctgataa artgtttctg cagctgctct aagctscct ttgctttgtc tacatttgg 420  
 aagmtcacca agcttggact ccacctgat gttgttacct tcaccacct kctccayga 480  
 ttrtgygtgg aaratagggk ttctgaagcy ttgratttkt ttcacaaat gtttgaaacg 540  
 rcatgtaggc ccaatgtcgt aaccttcacc actttgatga acggtctttg ccgcgagggt 600  
 agaattgtcg aagccgtagc tctrcttgat cggatgatgg aagatggtct ccagcctacc 660  
 cagattactt atggaacaat cgtagatggg atgtgtaaga agggagatac tgtgtctgca 720

ctgaatctgc tgaggaagat ggaggaggtg agccacatca tacccaatgt tgtaatctat 780  
 agtgcaatca ttgatagcct ttgtaaagac ggacgtcata gcgatkewca aaatcttttc 840  
 actgaaatgc aagagaaagg aatctttccm gatttatitta cctacaacwg tatgatmrwy 900  
 ggkttttgta gctctggtag atggakcgac gcggagcagt tgttgcaaga aatgtagaa 960  
 aggaagatca gccctgatgt tgtaacttat aatgctttga tcaatgcatt tgtcaaggaa 1020  
 ggcaagttct ttgaggctga agaattatac gatgagatgc ttccwagggg tataatccct 1080  
 aatacaatca catatagttc aatgatcgat ggattttgca aacagaatcg tcttgatgct 1140  
 gctgagcaca tgttttatit gatgsctacc aagggtctgt ctccsract awtcactttc 1200  
 aatactctca tagacggata tygtggggct aagaggatag atgatggaat ggaacttctc 1260  
 catgagatga ctgaarcagg attagttgct racacaryta cttacaacac tcttattcac 1320  
 gggttytrtc wgggtgggca tcttamtgct gctctagacc ttttacawga gatgatyctt 1380  
 agtggtktgt gccctratrt cgttacttgt rrcactttgc tggatggtct ctgcgataay 1440  
 gggaaactaa aagatgcatk ggaamtgttt aaggttatgc agaagagtaa gawggatctt 1500  
 gatgctagtc accccttcaa tgggtgtgaa cctgatgttc aaacttacia tatattgatc 1560  
 agcggcttga tcaatgaagg gaagttttta gaggcygagg aattatacra ggagatgccc 1620  
 cacaggggta tagtcccaga tactatyacc tatagctcaa tgatcgatgg aytatgcaag 1680  
 cagagccgcc trgatgagge tacacaaatg tttgattcga tgggtagcaa gagcttctct 1740  
 ccaaacgtag tgacctttac tacactcatt ratggctact gtaargcagg aagggttgat 1800  
 gatgggctgg agcttttctg cgagatgggt mgaagaggga tagttgctaa yrcaattact 1860  
 tacatcactt tgattygtgg ttttcgyaaw gtgggtaata ttaatggggc tctagacatt 1920  
 ttccaggaga tgatttcaag tgggtgtgat cctgrtayca ttacyatccg cartatgctg 1980  
 actggtttat ggagtaaaga ggaactaaaa aggrcagtg caatgcttga graactgcag 2040  
 atgagtrtgg rkywwymrtt kgrggrwkra tga 2073

<210> 24

<211> 2064

<212> DNA

<213> Raphanus



&lt;400&gt; 24

atgttgcta gggtttgtgg attcaagtgt tcttcttctc ctgctgagtc tgcggctaga 60  
 ttgttctgta cgagatcgat tcgtgatact ctggccaagg caagcggaga gagttgcaa 120  
 gcaggttttg gaggagagag tttgaagctg caaagtgggt ttcataaaat caaaggttta 180  
 gaggatgca ttgatttggt cagtacatg ctccgatctc gtcctttacc ttctgtggtt 240  
 gatttctgta aattgatggg tgtggtggg agaatggaac gcccgatct tgtgatttct 300  
 ctctatcara agatggaaag gaaacagatt csatgtgatr tatacagctt yaatattctg 360  
 ataaaatgtt tctgcagytg ctctaagcty ccctttgctt tgtctacatt tggtaagmtc 420  
 accaagcttg gactccaccc tgatgttgyt acctcamca cctgctcca yggatttrgy 480  
 stkgawraka gggtttctga agcyttgrat tktttctc aaatgttga aacgacatgt 540  
 aggccsaayr tcrtaacstt yaccackytg atgaacggtc tttgcyrca gggtagartt 600  
 gtcaagcyg tagctctgct tgatcgatg mtrgaagatg gtctccagcc trmccagatt 660  
 acttayggaa caatygtaga ygggatgtgt aagawgggag ayactgtgtc tgcaytgaat 720  
 ctktgagga agatggagga gktgagccac atcawacca atgtkgtaat ctatagtcm 780  
 atcattgata gcctttgtaa agacggacgt catagcgatg cacaaaatct tttactgaa 840  
 atgcaagaga aaggaatctt tcccgattta tttacctaca acagtatgat agttggtttt 900  
 tgtagctctg gtagatggag cgacgggag cagttgttg aagaaatgtt agaaaggaag 960  
 atcagccctg atgttgtaac ttataatgct ttgatcaatg catttgtcaa ggaaggcaag 1020  
 ttctttgagg ctgaagaatt atacgatgag atgcttcaa ggggtataat ccctaataca 1080  
 atcacatata gttcaatgat cgatggattt tgcaaacaga atcgtcttga tgctgctgag 1140  
 cacatgtttt atttgatggc taccaagggc tgctctcca acctaatcac tttcaatact 1200  
 ctcatagacg gatattgtgg ggctaagagg atagatgatg gaatggaact tctccatgag 1260  
 atgactgaaa caggattagt tgctgacaca actacttaca acactcttat tcacgggttc 1320  
 tatctggtgg gcgatcttaa tgctgctcta gacctttac aagagatgat ctctagtgtt 1380  
 ttgtgccctg atatcggtac ttgtgacact ttgtggatg gtctctgca taatgggaaa 1440  
 ctaaaagatg cattggaaat gtttaagggt atgcagaaga gtaagaagga tcttgatgct 1500  
 agtcaccct tcaatggtgt ggaacctgat gttcaactt acaatatatt gatcagcggc 1560

ttgatcaatg aagggaagtt tttagaggcc gaggaattat acgaggagat gccccacagg 1620  
 ggtatagtcc cagatactat cacctatagc tcaatgatcg atggattatg caagcagagc 1680  
 cgccatgatg aggctacaca aatgtttgat tcgatgggta gcaagagctt ctctccaaac 1740  
 gtagtgacct ttactacact cattaatggc tactgtaagg caggaagggt tgatgatggg 1800  
 ctggagcttt tctgcgagat gggtcgaaga gggatagttg ctaacgcaat tacttacatc 1860  
 actttgattt gtggttttcg taaagtgggt aatattaatg gggctctaga cattttccag 1920  
 gagatgattt caagtgggtg gtatcctgat accattacca tccgcaatat gctgactggg 1980  
 ttatggagta aagaggaact aaaaagggca gtggcaatgc ttgagaaact gcagatgagt 2040  
 atggatctat catttggggg atga 2064

<210> 25

<211> 2064

<212> DNA

<213> Raphanus

<400> 25

atgttggtta gggtttgttg attcaagtgt tcttcttctc ctgctgagtc tgcggctaga 60  
 ttgttctgta cgagatcgat tcgtgatact ctggccaagg caagcggaga gaggttgcgaa 120  
 gcaggttttg gaggagagag tttgaagctg caaagtgggt ttcattgaaat caaaggttta 180  
 gaggatgcga ttgatttggt cagtgcacatg ctctgatctc gtcctttacc ttctgtgggt 240  
 gatttctgta aattgatggg tgtgggtggg agaattggaac gcccggtatc tgtgatttct 300  
 ctctatcaga agatggaaag gaaacagatt cgatgtgata tatacagctt caatattctg 360  
 ataaaatggt tctgcagctg ctctaagctc ccctttgctt tgtctacatt tggttaagmtc 420  
 accaagcttg gactccaccc tgatgttggt accttcacca ccctgctcca yggatttrtgy 480  
 gtggaagata gggtttctga agcyttgrat tkttttcatc aaatgtttga aacgacatgt 540  
 aggcccaatg tcgtaacctt caccactttg atgaacgggc ttgcccgcga gggtagaatt 600  
 gtcgaagccg tagctctgct tgatcggatg atggaagatg gtctccagcc taccagatt 660  
 acttatggaa caatcgtaga tgggatgtgt aagaaggag atactgtgtc tgcactgaat 720  
 ctgctgagga agatggagga ggtgagccac atcataccca atgttgtaat ctatagtgc 780

atcattgata gcctttgtaa agacggacgt catagcgatg cacaaaatct ttctactgaa 840  
 atgcaagaga aaggaatctt tcccgattta ttacctaca acagtatgat agttggtttt 900  
 ttagactctg gtagatggag cgacgoggag cagttgttgc aagaaatggt agaaaggaag 960  
 atcagccctg atgttgtaac ttataatgct ttgatcaatg catttgtcaa ggaaggcaag 1020  
 ttctttgagg ctgaagaatt atacgatgag atgcttccaa ggggtataat ccctaataca 1080  
 atcacatata gttcaatgat cgatggattt tgcaaacaga atcgtcttga tgctgctgag 1140  
 cacatgtttt atttgatggc taccaagggc tgctctccca acctaatcac ttccaatact 1200  
 ctcatagacg gatattgtgg ggctaagagg atagatgatg gaatggaact tctccatgag 1260  
 atgactgaaa caggattagt tgctgacaca actacttaca acactcttat tcacgggttc 1320  
 tatctgggtg gcgatcttaa tgctgctcta gaccttttac aagagatgat ctctagtgg 1380  
 ttgtgccctg atatcgttac ttgtgacact ttgtggatg gtctctgcga taatgggaaa 1440  
 ctaaaagatg cattggaaat gttaaagggt atgcagaaga gtaagaagga tcttgatgct 1500  
 agtcacccct tcaatgggtg ggaacctgat gttcaaacctt acaatatatt gatcagcggc 1560  
 ttgatcaatg aagggaagtt tttagaggcc gaggaattat acgaggagat gcccacagg 1620  
 ggtatagtcc cagatactat cacctatagc tcaatgatcg atggattatg caagcagagc 1680  
 cgctagatg aggctacaca aatgtttgat togatgggta gcaagagctt ctctccaaac 1740  
 gtagtgacct ttactacact cattaatggc tactgtaagg caggaagggt tgatgatggg 1800  
 ctggagcttt tctgcgagat gggtcgaaga gggatagttg ctaacgcaat tacttacatc 1860  
 actttgattt gtggttttcg taaagtgggt aatattaatg gggctctaga cattttccag 1920  
 gagatgattt caagtgggtg gtatcctgat accattacca tccgcaatat gctgactgg 1980  
 ttatggagta aagaggaact aaaaagggca gtggcaatgc ttgagaaact gcagatgagt 2040  
 atggatctat catttggggg atga 2064

<210> 26

<211> 690

<212> PRT

<213> Raphanus

<220>

<221> Xaa  
<222> 16  
<223> Glu or Val  
<221> Xaa  
<222> 36  
<223> Arg or none  
<221> Xaa  
<223> 37, Asp or none  
<221> Xaa  
<222> 95  
<223> Glu or Lys  
<221> Xaa  
<222> 99  
<223> leu or Val  
<221> Xaa  
<222> 104  
<223> Tyr or His  
<221> Xaa  
<222> 105  
<223> Gln or Lys  
<221> Xaa  
<222> 109  
<223> Arg or Met  
<221> Xaa  
<222> 110  
<223> Lys or Arg  
<221> Xaa

<222> 111  
<223> Gln or Arg  
<221> Xaa  
<222> 113  
<223> Arg or Pro  
<221> Xaa  
<222> 116  
<223> Ile, Ala or Val  
<221> Xaa  
<222> 142  
<223> Leu or Ile  
<221> Xaa  
<222> 152  
<223> Val or Ala  
<221> Xaa  
<222> 155  
<223> Thr or Asn  
<221> Xaa  
<222> 163  
<223> Val, or Leu  
<221> Xaa  
<222> 164  
<223> Glu or Asp  
<221> Xaa  
<222> 165  
<223> Asp, Asn or Lys  
<221> Xaa

<222> 167  
<223> Val or Gly  
<221> Xaa  
<222> 172  
<223> Asn or Asp  
<221> Xaa  
<222> 173  
<223> Leu or Phe  
<221> Xaa  
<222> 186  
<223> Val or Ile  
<221> Xaa  
<222> 187  
<223> Val or Ile  
<221> Xaa  
<222> 198  
<223> Arg or Tyr  
<221> Xaa  
<222> 202  
<223> Ile or Val  
<221> Xaa  
<222> 213  
<223> Met or Leu  
<221> Xaa  
<222> 220  
<223> Thr or Asp  
<221> Xaa

<222> 234  
<223> Lys or Met  
<221> Xaa  
<222> 250  
<223> Val or Leu  
<221> Xaa  
<222> 254  
<223> Ile or Lys  
<221> Xaa  
<222> 276  
<223> Ala or Ser  
<221> Xaa  
<222> 297  
<223> Ser or Cys  
<221> Xaa  
<222> 300  
<223> Val or Asn  
<221> Xaa  
<222> 309  
<223> Ser or Ile  
<221> Xaa  
<222> 389  
<223> Ala or Pro  
<221> Xaa  
<222> 396  
<223> Asn or Asp  
<221> Xaa

<222> 397  
<223> Leu or Val  
<221> Xaa  
<222> 398  
<223> Ile or Phe  
<221> Xaa  
<222> 408  
<223> Cys or Arg  
<221> Xaa  
<222> 426  
<223> Thr or Ala  
<221> Xaa  
<222> 431  
<223> Asp or Asn  
<221> Xaa  
<222> 433  
<223> Thr or Val  
<221> Xaa  
<222> 443  
<223> Tyr or Cys  
<221> Xaa  
<222> 444  
<223> Leu or Gln  
<221> Xaa  
<222> 449  
<223> Asn or Thr  
<221> Xaa



<222> 456  
<223> Gln or His  
<221> Xaa  
<222> 463  
<223> Leu or Val  
<221> Xaa  
<222> 466  
<223> Asp or Asn  
<221> Xaa  
<222> 467  
<223> Ile or Val  
<221> Xaa  
<222> 471  
<223> Asp or Ser  
<221> Xaa  
<222> 487  
<223> Leu or Trp  
<221> Xaa  
<222> 489  
<223> Met or Leu  
<221> Xaa  
<222> 498  
<223> Lys or Met  
<221> Xaa  
<222> 537  
<223> Glu or Lys  
<221> Xaa

<222> 591  
<223> Asn or Asp  
<221> Xaa  
<222> 618  
<223> Ala or Thr  
<221> Xaa  
<222> 626  
<223> Cys or Arg  
<221> Xaa  
<222> 630  
<223> Lys or Asn  
<221> Xaa  
<222> 652  
<223> Asp or Gly  
<221> Xaa  
<222> 653  
<223> Thr or Ile  
<221> Xaa  
<222> 658  
<223> Asn or Ser  
<221> Xaa  
<222> 672  
<223> Ala or Thr  
<221> Xaa  
<222> 678  
<223> Lys or Glu  
<221> Xaa

<222> 683  
 <223> Met or Val  
 <221> Xaa  
 <222> 684  
 <223> Asp or Gly  
 <221> Xaa  
 <222> 685  
 <223> Leu or Tyr  
 <221> Xaa  
 <222> 686  
 <223> Ser or Gln  
 <221> Xaa  
 <222> 687  
 <223> Phe or Leu  
 <221> Xaa  
 <222> 688  
 <223> Gly or Glu  
 <221> Xaa  
 <222> 689  
 <223> Gly or Asp  
 <221> Xaa  
 <222> 690  
 <223> Glu or none  
 <400> 26

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Xaa

1                      5                      10                      15

Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

	20		25		30										
Lys	Ala	Ser	Xaa	Xaa	Gly	Glu	Ser	Cys	Glu	Ala	Gly	Phe	Gly	Gly	Glu
	35		40		45										
Ser	Leu	Lys	Leu	Gln	Ser	Gly	Phe	His	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Glu	Asp
	50		55		60										
Ala	Ile	Asp	Leu	Phe	Ser	Asp	Met	Leu	Arg	Ser	Arg	Pro	Leu	Pro	Ser
	65		70		75										80
Val	Val	Asp	Phe	Cys	Lys	Leu	Met	Gly	Val	Val	Val	Arg	Met	Xaa	Arg
			85		90										95
Pro	Asp	Xaa	Val	Ile	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Lys	Met	Glu	Xaa	Xaa	Xaa	Ile
	100		105		110										
Xaa	Cys	Asp	Xaa	Tyr	Ser	Phe	Asn	Ile	Leu	Ile	Lys	Cys	Phe	Cys	Ser
	115		120		125										
Cys	Ser	Lys	Leu	Pro	Phe	Ala	Leu	Ser	Thr	Phe	Gly	Lys	Xaa	Thr	Lys
	130		135		140										
Leu	Gly	Leu	His	Pro	Asp	Val	Xaa	Thr	Phe	Xaa	Thr	Leu	Leu	His	Gly
	145		150		155										160
Leu	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Ser	Glu	Ala	Leu	Xaa	Xaa	Phe	His	Gln
			165		170										175
Met	Phe	Glu	Thr	Thr	Cys	Arg	Pro	Asn	Xaa	Xaa	Thr	Phe	Thr	Thr	Leu
	180		185		190										
Met	Asn	Gly	Leu	Cys	Xaa	Glu	Gly	Arg	Xaa	Val	Glu	Ala	Val	Ala	Leu
	195		200		205										
Leu	Asp	Arg	Met	Xaa	Glu	Asp	Gly	Leu	Gln	Pro	Xaa	Gln	Ile	Thr	Tyr
	210		215		220										
Gly	Thr	Ile	Val	Asp	Gly	Met	Cys	Lys	Xaa	Gly	Asp	Thr	Val	Ser	Ala
	225		230		235										240

Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Xaa Ser His Ile Xaa Pro Asn  
                             245                            250                            255  
 Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg  
                             260                            265                            270  
 His Ser Asp Xaa Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile  
                             275                            280                            285  
 Phe Pro Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Xaa Met Ile Xaa Gly Phe Cys Ser  
                             290                            295                            300  
 Ser Gly Arg Trp Xaa Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu  
                             305                            310                            315                            320  
 Arg Lys Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala  
                             325                            330                            335  
 Phe Val Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu  
                             340                            345                            350  
 Met Leu Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met  
                             355                            360                            365  
 Ile Asp Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met  
                             370                            375                            380  
 Phe Tyr Leu Met Xaa Thr Lys Gly Cys Ser Pro Xaa Xaa Xaa Thr Phe  
                             385                            390                            395                            400  
 Asn Thr Leu Ile Asp Gly Tyr Xaa Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly  
                             405                            410                            415  
 Met Glu Leu Leu His Glu Met Thr Glu Xaa Gly Leu Val Ala Xaa Thr  
                             420                            425                            430  
 Xaa Thr Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Xaa Xaa Val Gly Asp Leu  
                             435                            440                            445  
 Xaa Ala Ala Leu Asp Leu Leu Xaa Glu Met Ile Ser Ser Gly Xaa Cys

450	455	460	
Pro Xaa Xaa Val Thr Cys Xaa Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn			
465	470	475	480
Gly Lys Leu Lys Asp Ala Xaa Glu Xaa Phe Lys Val Met Gln Lys Ser			
	485	490	495
Lys Xaa Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp			
	500	505	510
Val Gln Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys			
	515	520	525
Phe Leu Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Xaa Glu Met Pro His Arg Gly Ile			
	530	535	540
Val Pro Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys			
545	550	555	560
Gln Ser Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser			
	565	570	575
Lys Ser Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Xaa Gly			
	580	585	590
Tyr Cys Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu			
	595	600	605
Met Gly Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Xaa Ile Thr Tyr Ile Thr Leu			
	610	615	620
Ile Xaa Gly Phe Arg Xaa Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile			
625	630	635	640
Phe Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Xaa Xaa Ile Thr Ile			
	645	650	655
Arg Xaa Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Xaa			
	660	665	670

Val Ala Met Leu Glu Xaa Leu Gln Met Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

675

680

685

Xaa Xaa

690

<210> 27

<211> 690

<212> PRT

<213> Raphanus

<220>

<221> Xaa

<222> 16

<223> Glu or Val

<221> Xaa

<222> 36

<223> Arg or none

<221> Xaa

<223> 37, Asp or none

<221> Xaa

<222> 95

<223> Glu or Lys

<221> Xaa

<222> 99

<223> leu or Val

<221> Xaa

<222> 104

<223> Tyr or His

<221> Xaa

<222> 105  
<223> Gln or Lys  
<221> Xaa  
<222> 109  
<223> Arg or Met  
<221> Xaa  
<222> 110  
<223> Lys or Arg  
<221> Xaa  
<222> 111  
<223> Gln or Arg  
<221> Xaa  
<222> 113  
<223> Arg or Pro  
<221> Xaa  
<222> 116  
<223> Ile or Ala  
<221> Xaa  
<222> 142  
<223> Leu or Ile  
<221> Xaa  
<222> 165  
<223> Asp or Asn  
<221> Xaa  
<222> 167  
<223> Val or Gly  
<221> Xaa





<222> 398  
<223> Ile or Phe  
<221> Xaa  
<222> 408  
<223> Cys or Arg  
<221> Xaa  
<222> 426  
<223> Thr or Ala  
<221> Xaa  
<222> 431  
<223> Asp or Asn  
<221> Xaa  
<222> 433  
<223> Thr or Val  
<221> Xaa  
<222> 443  
<223> Tyr or Cys  
<221> Xaa  
<222> 444  
<223> Leu or Gln  
<221> Xaa  
<222> 449  
<223> Asn or Thr  
<221> Xaa  
<222> 456  
<223> Gln or His  
<221> Xaa

<222> 463  
<223> Leu or Val  
<221> Xaa  
<222> 466  
<223> Asp or Asn  
<221> Xaa  
<222> 467  
<223> Ile or Val  
<221> Xaa  
<222> 471  
<223> Asp or Ser  
<221> Xaa  
<222> 487  
<223> Leu or Trp  
<221> Xaa  
<222> 489  
<223> Met or Leu  
<221> Xaa  
<222> 498  
<223> Lys or Met  
<221> Xaa  
<222> 537  
<223> Glu or Lys  
<221> Xaa  
<222> 591  
<223> Asn or Asp  
<221> Xaa

<222> 618  
<223> Ala or Thr  
<221> Xaa  
<222> 626  
<223> Cys or Arg  
<221> Xaa  
<222> 630  
<223> Lys or Asn  
<221> Xaa  
<222> 652  
<223> Asp or Gly  
<221> Xaa  
<222> 653  
<223> Thr or Ile  
<221> Xaa  
<222> 658  
<223> Asn or Ser  
<221> Xaa  
<222> 672  
<223> Ala or Thr  
<221> Xaa  
<222> 678  
<223> Lys or Glu  
<221> Xaa  
<222> 683  
<223> Met or Val  
<221> Xaa

<222> 684

<223> Asp or Gly

<221> Xaa

<222> 685

<223> Leu or Tyr

<221> Xaa

<222> 686

<223> Ser or Gln

<221> Xaa

<222> 687

<223> Phe or Leu

<221> Xaa

<222> 688

<223> Gly or Glu

<221> Xaa

<222> 689

<223> Gly or Asp

<221> Xaa

<222> 690

<223> Glu or none

<400> 27

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Xaa

1 5 10 15

Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20 25 30

Lys Ala Ser Xaa Xaa Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu

35 40 45

Ser Leu Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp  
 50 55 60  
 Ala Ile Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Val Val Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Xaa Arg  
 85 90 95  
 Pro Asp Xaa Val Ile Ser Leu Xaa Xaa Lys Met Glu Xaa Xaa Xaa Ile  
 100 105 110  
 Xaa Cys Asp Xaa Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser  
 115 120 125  
 Cys Ser Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Xaa Thr Lys  
 130 135 140  
 Leu Gly Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Cys Val Glu Xaa Arg Xaa Ser Glu Ala Leu Xaa Xaa Phe His Gln  
 165 170 175  
 Met Phe Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu  
 180 185 190  
 Met Asn Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu  
 195 200 205  
 Leu Asp Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr  
 210 215 220  
 Gly Thr Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Asn Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn  
 245 250 255  
 Val Val Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg

260	265	270
His Ser Asp Xaa Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile		
275	280	285
Phe Pro Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Xaa Met Ile Xaa Gly Phe Cys Ser		
290	295	300
Ser Gly Arg Trp Xaa Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu		
305	310	315
Arg Lys Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala		
325	330	335
Phe Val Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu		
340	345	350
Met Leu Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met		
355	360	365
Ile Asp Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met		
370	375	380
Phe Tyr Leu Met Xaa Thr Lys Gly Cys Ser Pro Xaa Xaa Xaa Thr Phe		
385	390	395
Asn Thr Leu Ile Asp Gly Tyr Xaa Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly		
405	410	415
Met Glu Leu Leu His Glu Met Thr Glu Xaa Gly Leu Val Ala Xaa Thr		
420	425	430
Xaa Thr Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Xaa Xaa Val Gly Asp Leu		
435	440	445
Xaa Ala Ala Leu Asp Leu Leu Xaa Glu Met Ile Ser Ser Gly Xaa Cys		
450	455	460
Pro Xaa Xaa Val Thr Cys Xaa Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn		
465	470	475
		480

Gly Lys Leu Lys Asp Ala Xaa Glu Xaa Phe Lys Val Met Gln Lys Ser  
 485 490 495  
 Lys Xaa Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp  
 500 505 510  
 Val Gln Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys  
 515 520 525  
 Phe Leu Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Xaa Glu Met Pro His Arg Gly Ile  
 530 535 540  
 Val Pro Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys  
 545 550 555 560  
 Gln Ser Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser  
 565 570 575  
 Lys Ser Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Xaa Gly  
 580 585 590  
 Tyr Cys Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu  
 595 600 605  
 Met Gly Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Xaa Ile Thr Tyr Ile Thr Leu  
 610 615 620  
 Ile Xaa Gly Phe Arg Xaa Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile  
 625 630 635 640  
 Phe Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Xaa Xaa Ile Thr Ile  
 645 650 655  
 Arg Xaa Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Xaa  
 660 665 670  
 Val Ala Met Leu Glu Xaa Leu Gln Met Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 675 680 685  
 Xaa Xaa



690

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 687

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Raphanus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 111

&lt;223&gt; Arg or Pro

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 114

&lt;222&gt; Ile or Val

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 140

&lt;223&gt; Leu or Ile

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 150

&lt;223&gt; Val or Ala

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 153

&lt;223&gt; Thr or Asn

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 161

&lt;223&gt; Val or Leu

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 162

&lt;223&gt; Glu or Asp

<221> Xaa  
<222> 163  
<223> Asp or Lys  
<221> Xaa  
<222> 170  
<223> Asn or Asp  
<221> Xaa  
<222> 171  
<223> Leu or Phe  
<221> Xaa  
<222> 184  
<223> Val or Ile  
<221> Xaa  
<222> 185  
<223> Val or Ile  
<221> Xaa  
<222> 196  
<223> Arg or Tyr  
<221> Xaa  
<222> 200  
<223> Ile or Val  
<221> Xaa  
<222> 211  
<223> Met or Leu  
<221> Xaa  
<222> 218  
<223> Thr or Asp

<221> Xaa

<222> 232

<223> Lys or Met

<221> Xaa

<222> 248

<223> Val or Leu

<221> Xaa

<222> 252

<223> Ile or Lys

<400> 28

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu

1 5 10 15

Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala

20 25 30

Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu

35 40 45

Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile

50 55 60

Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val

65 70 75 80

Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp

85 90 95

Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Xaa Cys

100 105 110

Asp Xaa Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser

115 120 125

Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Xaa Thr Lys Leu Gly

130	135	140	
Leu His Pro Asp Val Xaa Thr Phe Xaa Thr Leu Leu His Gly Leu Cys			
145	150	155	160
Xaa Xaa Xaa Arg Val Ser Glu Ala Leu Xaa Xaa Phe His Gln Met Phe			
	165	170	175
Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Xaa Xaa Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn			
	180	185	190
Gly Leu Cys Xaa Glu Gly Arg Xaa Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp			
195	200	205	
Arg Met Xaa Glu Asp Gly Leu Gln Pro Xaa Gln Ile Thr Tyr Gly Thr			
210	215	220	
Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Xaa Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn			
225	230	235	240
Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Xaa Ser His Ile Xaa Pro Asn Val Val			
	245	250	255
Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser			
	260	265	270
Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro			
275	280	285	
Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly			
290	295	300	
Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys			
305	310	315	320
Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val			
	325	330	335
Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu			
340	345	350	

Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp  
 355 360 365  
 Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr  
 370 375 380  
 Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr  
 385 390 395 400  
 Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu  
 405 410 415  
 Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr  
 420 425 430  
 Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala  
 435 440 445  
 Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp  
 450 455 460  
 Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys  
 485 490 495  
 Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln  
 500 505 510  
 Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu  
 515 520 525  
 Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro  
 530 535 540  
 Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser  
 545 550 555 560  
 Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser

565 570 575  
Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys  
580 585 590  
Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly  
595 600 605  
Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys  
610 615 620  
Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln  
625 630 635 640  
Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn  
645 650 655  
Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala  
660 665 670  
Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly  
675 680 685

<210> 29

<211> 687

<212> PRT

<213> Raphanus

<220>

<221> Xaa

<222> 140

<223> Leu or Ile

<221> Xaa

<222> 170

<223> Asn or Asp

<221> Xaa

&lt;222&gt; 171

&lt;223&gt; Leu or Phe

&lt;400&gt; 29

Met Leu Ala Arg Val Cys Gly Phe Lys Cys Ser Ser Ser Pro Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ala Arg Leu Phe Cys Thr Arg Ser Ile Arg Asp Thr Leu Ala  
 20 25 30  
 Lys Ala Ser Gly Glu Ser Cys Glu Ala Gly Phe Gly Gly Glu Ser Leu  
 35 40 45  
 Lys Leu Gln Ser Gly Phe His Glu Ile Lys Gly Leu Glu Asp Ala Ile  
 50 55 60  
 Asp Leu Phe Ser Asp Met Leu Arg Ser Arg Pro Leu Pro Ser Val Val  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Cys Lys Leu Met Gly Val Val Val Arg Met Glu Arg Pro Asp  
 85 90 95  
 Leu Val Ile Ser Leu Tyr Gln Lys Met Glu Arg Lys Gln Ile Arg Cys  
 100 105 110  
 Asp Ile Tyr Ser Phe Asn Ile Leu Ile Lys Cys Phe Cys Ser Cys Ser  
 115 120 125  
 Lys Leu Pro Phe Ala Leu Ser Thr Phe Gly Lys Xaa Thr Lys Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu His Pro Asp Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Leu His Gly Leu Cys  
 145 150 155 160  
 Val Glu Asp Arg Val Ser Glu Ala Leu Xaa Xaa Phe His Gln Met Phe  
 165 170 175  
 Glu Thr Thr Cys Arg Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Met Asn  
 180 185 190

Gly Leu Cys Arg Glu Gly Arg Ile Val Glu Ala Val Ala Leu Leu Asp  
 195 200 205  
 Arg Met Met Glu Asp Gly Leu Gln Pro Thr Gln Ile Thr Tyr Gly Thr  
 210 215 220  
 Ile Val Asp Gly Met Cys Lys Lys Gly Asp Thr Val Ser Ala Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Arg Lys Met Glu Glu Val Ser His Ile Ile Pro Asn Val Val  
 245 250 255  
 Ile Tyr Ser Ala Ile Ile Asp Ser Leu Cys Lys Asp Gly Arg His Ser  
 260 265 270  
 Asp Ala Gln Asn Leu Phe Thr Glu Met Gln Glu Lys Gly Ile Phe Pro  
 275 280 285  
 Asp Leu Phe Thr Tyr Asn Ser Met Ile Val Gly Phe Cys Ser Ser Gly  
 290 295 300  
 Arg Trp Ser Asp Ala Glu Gln Leu Leu Gln Glu Met Leu Glu Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Ile Ser Pro Asp Val Val Thr Tyr Asn Ala Leu Ile Asn Ala Phe Val  
 325 330 335  
 Lys Glu Gly Lys Phe Phe Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Asp Glu Met Leu  
 340 345 350  
 Pro Arg Gly Ile Ile Pro Asn Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp  
 355 360 365  
 Gly Phe Cys Lys Gln Asn Arg Leu Asp Ala Ala Glu His Met Phe Tyr  
 370 375 380  
 Leu Met Ala Thr Lys Gly Cys Ser Pro Asn Leu Ile Thr Phe Asn Thr  
 385 390 395 400  
 Leu Ile Asp Gly Tyr Cys Gly Ala Lys Arg Ile Asp Asp Gly Met Glu



405	410	415
Leu Leu His Glu Met Thr Glu Thr Gly Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr		
420	425	430
Tyr Asn Thr Leu Ile His Gly Phe Tyr Leu Val Gly Asp Leu Asn Ala		
435	440	445
Ala Leu Asp Leu Leu Gln Glu Met Ile Ser Ser Gly Leu Cys Pro Asp		
450	455	460
Ile Val Thr Cys Asp Thr Leu Leu Asp Gly Leu Cys Asp Asn Gly Lys		
465	470	475
Leu Lys Asp Ala Leu Glu Met Phe Lys Val Met Gln Lys Ser Lys Lys		
485	490	495
Asp Leu Asp Ala Ser His Pro Phe Asn Gly Val Glu Pro Asp Val Gln		
500	505	510
Thr Tyr Asn Ile Leu Ile Ser Gly Leu Ile Asn Glu Gly Lys Phe Leu		
515	520	525
Glu Ala Glu Glu Leu Tyr Glu Glu Met Pro His Arg Gly Ile Val Pro		
530	535	540
Asp Thr Ile Thr Tyr Ser Ser Met Ile Asp Gly Leu Cys Lys Gln Ser		
545	550	555
Arg Leu Asp Glu Ala Thr Gln Met Phe Asp Ser Met Gly Ser Lys Ser		
565	570	575
Phe Ser Pro Asn Val Val Thr Phe Thr Thr Leu Ile Asn Gly Tyr Cys		
580	585	590
Lys Ala Gly Arg Val Asp Asp Gly Leu Glu Leu Phe Cys Glu Met Gly		
595	600	605
Arg Arg Gly Ile Val Ala Asn Ala Ile Thr Tyr Ile Thr Leu Ile Cys		
610	615	620

Gly Phe Arg Lys Val Gly Asn Ile Asn Gly Ala Leu Asp Ile Phe Gln  
625                      630                      635                      640  
Glu Met Ile Ser Ser Gly Val Tyr Pro Asp Thr Ile Thr Ile Arg Asn  
                         645                      650                      655  
Met Leu Thr Gly Leu Trp Ser Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Val Ala  
                         660                      665                      670  
Met Leu Glu Lys Leu Gln Met Ser Met Asp Leu Ser Phe Gly Gly  
                         675                      680                      685

<210> 30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

acataaaaat cactagatac ttgacatgga ggc                      33

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 31

aagaggagga agatggcatc acagc                      25

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

tggagtaaag aggaactaaa aagggc 26

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

cagacaatag acgcataaaa ggc 23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

gattcctttc tcttgcatTT cag 23

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

atctcgtcct ttaccttctg tgg 23

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

gatccatgca tttgtcaagg 20

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

catttgtgta gcctcatcta gg 22

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

gtccggagag cagccottgg tag 23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

tcatcgtata attcttcagc ctc

23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/04092

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/415, C12N15/29, A01H1/00, A01H5/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/415, C12N15/29, A01H1/00, A01H5/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 599042 A (Mitsubishi Corp.), 01 June, 1994 (01.06.94), & JP 06-141716 A & US 5644066 A	1-31
A	WO 92/05251 A (Inst. Nat. Rech. Agronomique), 02 April, 1992 (02.04.92), & EP 549726 A & JP 2001-145497 A	1-31
A	US 5973233 A (Zenco (No.4) Ltd.), 26 October, 1999 (26.10.99), & WO 97/02737 A	1-31
A	Hiroshi YAMAGISHI, "Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes.", Genes Genet.Syst., 1998, Vol.73, No.2, pages 79 to 83	1-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 May, 2002 (30.05.02)

Date of mailing of the international search report

11 June, 2002 (11.06.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/04092

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Seiji MURAYAMA et al., Identification of RAPD and SCAR Markers Linked to a Restorer Gene for Ogura Cytoplasmic Male Sterility in Radish (Raphanus sativus L.) by Bulked Segregant Analysis. Breeding Science, 1999, Vol.49, No.2, pages 115 to 121	1-31

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/415, C12N15/29, A01H1/00, A01H5/00, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/415, C12N15/29, A01H1/00, A01H5/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 599042 A(MITSUBISHI CORP.) 1994.06.01 & JP 06-141716 A & US 5644066 A	1-31
A	WO 92/05251 A(INST. NAT. RECH. AGRONOMIQUE) 1992.04.02 & EP 549726 A & JP 2001-145497 A	1-31
A	US 5973233 A(Zenco(No.4)Limited) 1999.10.26 & WO 97/02737 A	1-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.05.02

国際調査報告の発送日

11.06.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hiroshi YAMAGISHI. Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes. Genes Genet. Syst. 1998, Vol. 73, No. 2, p. 79-83	1-31
A	Seiji MURAYAMA et al. Identification of RAPD and SCAR Markers Linked to a Restorer Gene for Ogura Cytoplasmic Male Sterility in Radish ( <i>Raphanus sativus</i> L.) by Bulk Segregant Analysis. Breeding Science. 1999, Vol. 49, No. 2, p. 115-121	1-31

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☒ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**